

Université de Sherbrooke

Le rôle de DUSP4 dans l'athérosclérose

Par
Donovan Fouere
Programme de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de
l'obtention du grade de maître ès en science (M. Sc.) en physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Été 2021

Membres du jury d'évaluation
Pedro Geraldès Ph.D., programme de Physiologie
Abdelaziz Amrani Ph.D., programme d'Immunologie
Mannix Auger-Messier Ph.D., programme de Physiologie

Donovan Fouere, Été 2021

Résumé

Le rôle de DUSP4 dans l'athérosclérose

Par

Donovan Fouere

Programme de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître en sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

L'athérosclérose est à l'origine de nombreuses maladies cardiovasculaires et il s'agit d'une des principales complications macrovasculaires qui est directement lié à l'obésité. Ce phénomène entraîne la formation de plaques de gras à l'intérieur de l'aorte due à l'accumulation de cholestérol dans l'espace sous-endothélial. Les voies de signalisations intracellulaires MAPK régissent l'ensemble des étapes menant à la formation de ces plaques et sont régulées par de nombreuses phosphatases comme les DUSPs. Notre laboratoire s'intéresse particulièrement aux rôles de DUSP4 sur le développement des maladies cardiovasculaires et les maladies rénales. Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer le rôle de DUSP4 dans le développement de l'athérosclérose. Quelques études ont révélé qu'une délétion de DUSP1 dans un modèle de souris *Apoe*^{-/-} entraîne une importante diminution du pourcentage de plaques athérosclérotiques. Est-ce que la délétion de DUSP4 chez une souris *Apoe*^{-/-} entraîne également une diminution de la pathologie? Nos objectifs de recherches sont de déterminer le rôle de DUSP4 sur le développement de l'athérosclérose ainsi que sur l'expression des marqueurs inflammatoires clés exprimés par les macrophages. Des modèles de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} ont été soumis à une diète riche en gras à partir de 2 mois d'âge et euthanasiés à 3 mois. L'aorte des souris a été soumise à une coloration en phase *Oil red O* pour calculer le pourcentage de plaque. L'artère bronchiocéphalique a été isolée pour l'observation de la complexité de la plaque par marquage immunohistochimique au trichrome de Masson, Mac-2 et α -SMA. Le sang a été récolté afin de déterminer le profil inflammatoire des différents groupes de souris par *Luminex* et cytométrie de flux. Les modèles de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-}, sans diète gras, ont été utilisés afin d'isoler les macrophages péritonéaux après stimulation au thioglycolate à 3 mois d'âge. Ces cellules ont été traitées avec et sans palmitate à 75 μ M durant 24h afin d'isoler les protéines et l'ARNm afin d'étudier l'activation de p38, ERK, JNK, l'expression de DUSP4 par immunobuvardage et l'expression de cytokines inflammatoires par RT-qPCR. *In vivo*, nos résultats ont démontré que le pourcentage de plaque, la complexité de la plaque et le profil proinflammatoire était fortement réduit chez les souris *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} par rapport aux souris *Apoe*^{-/-}. *Ex vivo*, nous avons observé que le palmitate active p38 et ERK et augmente l'expression de DUSP4 dans les macrophages. Nous avons constaté que la délétion DUSP4 a entraîné une suractivation de p38 et ERK avec le palmitate et augmentée l'expression de DUSP1, IL-1 α , CCL2 et M-CSF. En conclusion, nos résultats ont permis de montrer que la délétion de DUSP4 entraîne une diminution de l'athérosclérose et que le palmitate induit l'activation de p38 et ERK dans les macrophages. Le rôle de DUSP4 et du palmitate reste encore à préciser dans le processus inflammatoire menant au développement de l'athérosclérose.

Table des matières

Résumé.....	2
Table des matières.....	3
Liste des figures	5
Liste des tableaux	7
Liste des abréviations.....	8
1. Introduction	10
1.1. L'obésité.....	10
1.2. Les Lipides	11
1.2.1. La classification des lipides	11
1.2.2. Le métabolisme des AG et du cholestérol	13
1.2.3. Les lipoprotéines.....	15
1.2.4. Les formes de la dyslipidémie	18
1.3. Les maladies cardiovasculaires	19
1.3.1. L'athérosclérose.....	20
1.3.2. La maladie des artères périphériques.....	23
1.4. La physiologie du système cardiovasculaire	24
1.4.1. Généralité	24
1.4.2. L'anatomie de l'aorte.....	26
1.5. La physiologie du système immunitaire	28
1.5.1. Généralité	28
1.5.2. Le système immunitaire inné.....	29
1.5.3. Le système immunitaire adaptatif	32
1.6. Les facteurs inflammatoires.....	34
1.6.1. Les chemokines.....	34
1.6.2. Les cytokines.....	37
1.7. Voies de signalisation MAPK dans les monocytes/macrophages	43
1.7.1. La voie ERK1/2	44
1.7.2. La voie p38	46
1.7.3. La voie JNK	47
1.8. Les protéines tyrosines phosphatases.....	48
1.8.1. Les PTP classiques	48
1.8.2. Les DUSPs.....	49
1.8.3. Spécificité et Régulation	50
1.8.4. DUSP1	52
1.8.5. DUSP4	53
1.8.6. DUSP6	53
1.9. Les effets de la lipotoxicité sur les macrophages.....	54
Hypothèse/Problématique	57

Objectifs	58
2. Matériel et Méthodes.....	59
2.1. Modèle animal	59
2.2. La préparation du palmitate	60
2.3. Les macrophages murins péritonéaux.....	61
2.4. Analyses protéiques par immunobuvardage	62
2.5. Analyse de l'expression ARNm – PCR quantitative	67
2.5.1. Extraction ARNm/ Dosage Nanodrop	67
2.5.2. Transcriptase inverse en ADNc	67
2.5.3. qPCR.....	68
2.6. Analyse <i>Luminex</i>	70
2.7. Analyse par cytométrie de flux	72
2.8. Immunohistologie	72
2.9. Coloration par <i>Oil Red O</i> des aortes de souris	73
2.10. Analyses statistiques	74
3. Résultats	75
3.1. Projet <i>in vivo</i>	75
3.1.1. Les effets de DUSP4 sur la formation des plaques athérosclérotiques	75
3.1.2. Les effets de DUSP4 sur la structure de la plaque	76
3.1.3. Les effets de DUSP4 sur les niveaux des cytokines/chemokines en circulation	78
3.1.4. Le niveau de monocyte en circulation	81
3.2. Projet <i>ex vivo</i>	84
3.2.1. Les effets du palmitate et de DUSP4 sur l'expression de DUSP4 et sur l'activation des MAPK dans les macrophages péritonéaux.....	84
3.2.2. Les effets du palmitate et de DUSP4 sur l'expression des DUSPs et des marqueurs inflammatoires dans les macrophages péritonéaux	86
Discussion	91
Perspectives.....	101
Conclusion	104
Remerciement.....	105
Liste des références.....	106

Liste des figures

Figure 1 : Les membres de la famille des lipides

Figure 2 : Synthèse des céramides et de DAG à partir du Palmitoyl-CoA

Figure 3 : La composition des lipoprotéines en pourcentage

Figure 4 : Les lipoprotéines de transport

Figure 5 : La pathophysiologie de l'athérosclérose

Figure 6 : La structure d'une artère

Figure 7 : L'anatomie de l'aorte

Figure 8 : L'activation des macrophages

Figure 9 : La maturation des lymphocytes T CD4⁺ et leurs rôles dans l'athérosclérose

Figure 10 : Les voies de signalisations cellulaires MAPK

Figure 11 : Les différents sous-groupes de DUSPs et leurs structures

Figure 12 : Les différents mécanismes de régulation des DUSPs

Figure 13 : Organisation de l'expérience *in vivo*

Figure 14 : Le programme de qPCR

Figure 15 : Les effets de DUSP4 sur la formation des plaques athérosclérotiques

Figure 16 : Les effets de DUSP4 sur la complexité de la plaque

Figure 17 : Les effets de DUSP4 sur les niveaux des cytokines/chemokines en circulation

Figure 18 : Le niveau de granulocytes et de monocytes en circulation

Figure 19 : Les effets du palmitate sur l'expression de DUSP4 et de l'inactivation génétique de DUSP4 sur l'activation des MAPK dans les macrophages péritonéaux

Figure 20 : Les effets du palmitate sur l'expression de DUSP4 et de l'invalidation génétique de DUSP4 sur l'expression ARNm des DUSPs et des marqueurs inflammatoires dans les macrophages péritonéaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les valeurs d'indice de masse corporelle associé aux risques de complications cardiovasculaires

Tableau 2 : La nomenclature des AG à longue chaîne

Tableau 3 : La composition du tampon de lyse

Tableau 4 : La composition de Laemmli 4X

Tableau 5 : La composition pour 2 gels d'acrylamide

Tableau 6 : La liste des anticorps utilisés pour l'expérience d'immunobuvardage

Tableau 7 : La liste des amorces murines qPCR utilisées

Tableau 8 : La composition pour un échantillon et pour 24 échantillons de qPCR

Tableau 9 : La liste des billes utilisées dans l'expérience du *Luminex*

Tableau 10 : La préparation d'anticorps utilisé pour l'expérience de cytométrie de flux

Liste des abréviations

AG : Acides gras
Apo : Apolipoprotéines
Arg : Arginase
BCA : *Bronchiocephalitiqes artere*
CML : Cellules musculaires lisses
DAG : Diacylglycérol
DUSP : *Dual specificity phosphatase*
ERK : *Extracellular signal regulated kinases*
FBS : *Fetal bovin serum*
Gr-1 : Marqueur de granulocyte 1
HDL : *High density lipoprotein*
ICAM-1 : *Intracellular adhesion molecule 1*
IFN γ : Interféron gamma
IL : Interleukines
JNK : *c-Jun N-terminal kinase*
LDL : *Low density lipoprotein*
oxLDL : LDL oxydés
LFA-1 : *Lymphocyte function associated antigen 1*
LPS : Lipopolysaccharides
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
GM/M-CSF : *Granulocytes/macrophages colony stimulating factor*
MCP : *Monocyte chemoattractant protein 1*
NOX : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF κ B : *Nuclear factor κ B*
NO : *Nitric oxyde*
PBS : Solution saline tamponnée phosphate
P/S : Pénicilline/streptomycine
PTP : Protéines tyrosines phosphatases
RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RPM : Rotation par minute
RPMI : *Roswell Park Memorial Institute Medium*
RTK : Récepteurs à activité tyrosine kinase
ROS : *Radical oxygen species*
TG : Triglycérides
TGF β : *Transforming growth factor β*
Th/Treg : Lymphocytes T auxiliaires et régulateurs
TLR : Récepteurs de types *Toll-Like*
TNF α : *Tumor nuclear factor α*
VCAM-1 : *Vascular cell adhesion molecule 1*
VLA-4 : *Very late antigen 4*
VLDL : *Very low density lipoprotein*

1. Introduction

1.1. L'obésité

L'obésité se définit comme étant une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle représentant un risque pour la santé (WHO, 2017). L'obésité, le surpoids ou le poids normal sont classés en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC). Il s'agit du rapport (en kg/m²) se basant sur le poids (en kilogramme) en fonction de la taille (en mètre) de l'individu (**Tableau 1**).

Tableau 1: Les valeurs d'indice de masse corporelle associé aux risques de complications cardiovasculaires

	IMC (en kg/m ²)	Risques de complications cardiovasculaire
Obésité Morbide	Supérieur à 40	Très élevés
Obésité	Entre 30 et 40	Élevés
Surpoids	Entre 25 et 29,9	Accrus
Poids normal	Entre 18,5 et 24,9	Faibles
Maigreur	Inférieur à 18,5	Accrus

L'Organisation mondiale de la santé a répertorié en 2016 que plus de 1,9 milliard de la population mondiale était en situation de surpoids et que 650 millions d'entre eux étaient obèses. Ce chiffre a été multiplié par trois depuis 1975. En 2018 au Canada, environ 7,3 millions d'individus âgés de 18 ans et plus étaient obèses, soit environ 26,8 % de la population du pays. En outre, plus de 36 % de la population étaient en situation de surpoids (Statistique Canada, 2019). L'obésité est fortement liée au déséquilibre de la balance énergétique qui se compose de la consommation d'énergie et de la dépense d'énergie (Blüher *et al.*, 2019). Certaines perturbations génétiques peuvent également venir modifier cette balance énergétique (O'Rahilly *et al.*, 2006). En 1997, une étude a mis en évidence

chez une famille consanguine du Pakistan une mutation dans le gène codant pour la leptine, hormone de la satiété, menant à une diminution de sa production et donc à une importante disposition à l'obésité chez ces individus (Montague *et al.*, 1997). Ces paramètres sont fortement influencés par le manque d'activité physique ou par une alimentation inadéquate, qui sont les principales causes de ce phénomène. Les complications de l'obésité ne sont pas seulement esthétiques, mais touchent également l'ensemble des systèmes physiologiques. Les niveaux de lipides en circulation retrouvés chez les individus obèses et en surpoids augmentent le risque de dépôt de ces corps gras à l'intérieur des artères, favorisant ainsi le développement de nombreuses complications cardiovasculaires (Abbasi *et al.*, 2002). Le système immunitaire est également perturbé chez les personnes souffrant d'obésité. L'augmentation de la taille et du nombre d'adipocytes (lieux de stockage des lipides) favorise l'infiltration des cellules immunitaires et la sécrétion des molécules pro-inflammatoires ainsi que de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, la néphropathie ou le diabète (Shoelson *et al.*, 2007). Les complications cardiovasculaires sont les premières causes de mortalité au monde (WHO, 2017); par conséquent, la communauté scientifique du monde entier rassemble connaissances et ressources afin de lutter contre ce phénomène grandissant.

1.2. Les lipides

1.2.1. La classification des lipides

Les lipides font partie des trois principaux substrats énergétiques utilisés par la quasi-totalité des cellules de l'organisme. Ils se retrouvent principalement dans l'alimentation, mais peuvent également être synthétisés par les cellules. Ils sont regroupés en plusieurs sous-catégories et se distinguent les uns des autres par leurs structures chimiques. Il s'agit des triglycérides (TG), des acides gras (AG), des phospholipides membranaires, du glycérol et du cholestérol représentés dans la **Figure 1**. En plus de leur capacité à fournir de l'énergie, ils sont également utilisés pour la synthèse de certaines hormones, de molécules inflammatoires et participent à la fluidité et à la structure membranaire (de Carvalho *et al.*, 2018). Les AG sont regroupés en plusieurs sous-catégories réparties en

fonction de la longueur de leur chaîne latérale (petite, moyenne ou longue), du nombre d'insaturation de cette chaîne (polyinsaturée, mono-insaturée et saturée) et de l'orientation de l'insaturation (position *cis* ou position *trans*). Le **Tableau 2** rassemble les principales familles des AG à longue chaîne.

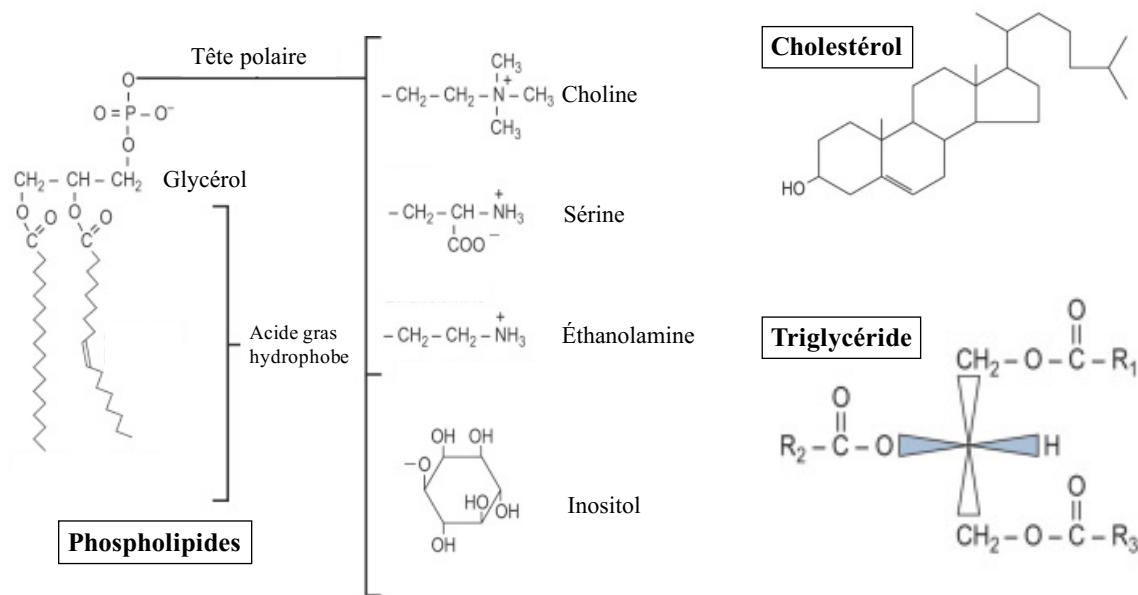


Figure 1 : Les membres de la famille des lipides.

Les phospholipides sont composés d'une molécule de diacylglycérol hydrophobe et d'une tête polaire pouvant prendre la forme de choline, de sérine, d'éthanolamine ou d'inositol. Le cholestérol est un composé métabolique important dans la structure et la fluidité des membranes cellulaires et dans la synthèse de certaines hormones. Les triglycérides sont composés d'une molécule de glycérol attachée par trois chaînes d'acide gras. Il s'agit de composés lipidiques représentant une grande réserve d'énergie qui sont principalement retrouvés dans les tissus adipeux (Adaptée de Fahy *et al.*, 2011).

Tableau 2 : La nomenclature des AG à longue chaîne

Acides gras saturés	Nom usuel	Nomenclature	Formule chimique
	Acide Laurique	12 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
	Acide Myristique	14 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
	Acide Palmitique	16 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
	Acide Stéarique	18 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
	Acide Arachidique	20 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Acides gras mono et polyinsaturés	Nom usuel	Nomenclature	Formule chimique
	Acide Palmitoléique	16 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
	Acide Oléique	18 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
	Acide Linoléique	18 : 2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
	Acide Linolénique	18 : 3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
	Acide Arachidonique	20 : 4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

Les AG sont classifiés selon leur structure chimique. Les AG saturés représentent les AG sans double liaison entre deux atomes de carbones et regroupent les acides lauriques, myristiques, palmitiques, stéariques et arachidiques. Les AG mono-insaturés composés majoritairement des acides palmitoléiques et oléiques regroupent les molécules possédant une insaturation. Les acides linoléiques, linoléniques et arachidoniques font partie de la famille des AG polyinsaturées (Adaptée de Cuvelier *et al.*, 2004).

1.2.2. Le métabolisme des AG et du cholestérol

La transformation des AG est principalement située à l'intérieur du tissu adipeux et du foie. Leur dégradation peut se faire dans l'ensemble des tissus à l'exception des organes glucodépendants comme le cerveau. Le métabolisme des AG comprend leur catabolisme en acétyl-CoA, leur synthèse à partir de ce dernier et leur élongation/désaturation. Sous l'action de la triglycéride lipase, les triglycérides sont dégradés en AG et glycérol à

l'intérieur de la cellule. Une fois dans la cellule, les AG sont catabolisés par la voie de la β -oxydation, qui les transforme en acétyl-CoA à l'intérieur des mitochondries afin de fournir de l'énergie sous forme d'ATP à la cellule. Cette oxydation aérobie n'étant pas réversible, les AG peuvent être synthétisés de trois manières, soit à partir de l'acétyl-CoA qui mène à la formation du palmitate, soit par élongation mitochondriale de ce dernier ou soit par l'élongation/désaturation menant à la formation des AG insaturés. Une fois formés, les AG participent à la synthèse de certaines molécules bioactives comme les céramides et des sphingolipides qui sont produites à partir de palmitoyl-CoA et la sérine. De plus, afin de reformer les triglycérides dont ils sont issus, les AG participent à la synthèse du 1,2 diacylglycérol (DAG), une autre molécule bioactive importante. La **Figure 2** présente un résumé de ces réactions. Ces composés participent à la régulation de certaines voies de signalisations cellulaires (Macrae *et al.*, 2013) et sont également impliqués dans le processus de plusieurs pathologies cardiovasculaires (Ota *et al.*, 2007 ; Erion *et al.*, 2010).

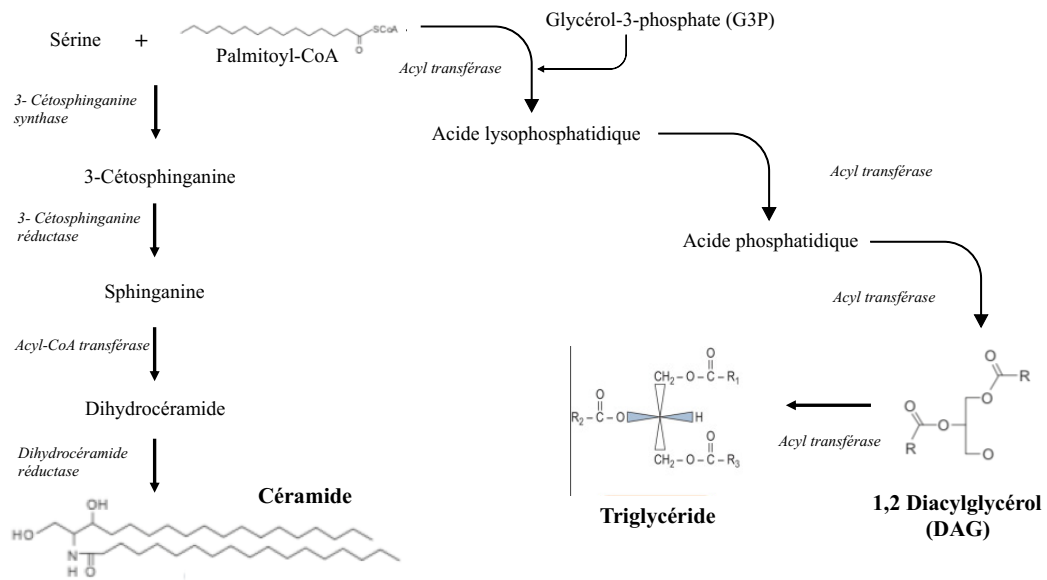


Figure 2 : Synthèse des céramides et de DAG à partir du Palmitoyl-CoA

Pour la synthèse du DAG, le palmitoyl-CoA est fusionné avec une molécule de glycérol 3 phosphate (G3P) grâce à la G3P acyltransférase pour former l'acide lysophosphatidique. Ce dernier est transformé en acide phosphatidique et DAG par l'action de deux acyl

transférases. Le DAG peut finalement poursuivre sa transformation en triglycéride. Pour la synthèse des céramides, l'ajout d'une molécule de sérine au palmitoyl-CoA entraîne la formation de la 3-Cétosphingamine sous l'action de la 3-Cétosphingamine synthétase. La 3-Cétosphingamine réductase, l'acyl-CoA transférase et la dihydrocéramide réductase achèvent la formation des céramides.

Le cholestérol est synthétisé à partir de l'acétyl-CoA, dans le foie et les intestins, pour participer à la synthèse des acides biliaires, des hormones stéroïdiennes et de la vitamine D ou être estérifié afin de faciliter son transport et son stockage. Le taux de cholestérol retrouvé en circulation est principalement assuré par la synthèse endogène qui représente les deux tiers du cholestérol. Le reste est assuré par l'apport alimentaire (Kapourchali *et al.*, 2016). Le cholestérol et les TG, étant des molécules hydrophobes, nécessitent d'être associés à des vésicules pour permettre leur transport vers l'ensemble de l'organisme.

1.2.3. Les lipoprotéines

Il existe 5 classes de lipoprotéines de transport qui se distinguent entre elles par leurs densités et leurs compositions en lipides et en protéines : les chylomicrons, les chylomicrons *remnant*, les *very low density lipoprotein* (VLDL), les *low density lipoprotein* (LDL) et les *high density lipoprotein* (HDL). La **Figure 3** représente un schéma de la composition lipidique des différentes lipoprotéines de transport.

Ces vésicules expriment différentes protéines membranaires ayant diverses fonctions : ce sont les apolipoprotéines (Apo). Une fois passée la barrière intestinale, les lipides alimentaires quittent les intestins, pour rejoindre la circulation sanguine abord des chylomicrons. La **Figure 4** présente un résumé schématisé du transport des lipides à travers les lipoprotéines. Ces derniers sont les vésicules les plus volumineuses et contiennent une importante quantité de lipides. Ils contiennent à leur surface l'Apo B48 qui permet leur transport vers les muscles et le tissu adipeux. Différentes études ont démontré qu'un niveau élevé d'Apo B48 en circulation corréle avec une augmentation du processus d'athérosclérose et des risques de développer un diabète de type 2. L'Apo C-2 est une autre apolipoprotéine clé, qui joue le rôle de coactivateur de la lipoprotéine lipase qui permet la

conversion des TG en AG, afin de faciliter l'entrée des lipides à l'intérieur des organes. Des modifications de certains gènes codants pour l'ApoC-2 et la lipoprotéine lipase sont retrouvées chez certaines personnes atteintes d'hypertriglycémie héréditaires (Johansen *et al.*, 2012). Issus des tissus périphériques, les chylomicrons remnants ont cédé une grande partie de leur TG, présentent des niveaux de cholestérol élevés et ont la particularité d'exprimer l'apolipoprotéine E qui a pour but de transporter le cholestérol exogène vers le foie. Un modèle murin n'exprimant pas cette protéine présente un niveau de chylomicron remnant et de VLDL élevé, ce qui en fait un modèle de choix utilisé par la plupart des groupes de recherches étudiant le développement de l'athérosclérose (Veseli *et al.*, 2017). Quittant le foie, les VLDL assurent le transport du cholestérol endogène vers les tissus périphériques. Ces lipoprotéines exprimant l'Apo B100 permettent la distribution des TG, des AG et du cholestérol aux tissus périphériques. Par la suite, elles sont recyclées dans le foie ou transformées en LDL. Connues dans le langage courant comme le « mauvais cholestérol », elles ont la plus haute concentration en cholestérol et expriment l'Apo C2 et l'Apo A. Ces vésicules de transport sont captées par les tissus périphériques et le foie qui possèdent des récepteurs spécifiques (LDLR) capables de les endocyter, mais ce sont les seules lipoprotéines capables d'être captées par les macrophages. Des modèles de souris *Ldlr*^{-/-} présentent un taux de LDL élevé en circulation, ce qui en fait aussi un modèle de choix pour l'étude de l'athérosclérose (Veseli *et al.*, 2017). L'internalisation des LDL par les macrophages sera détaillée dans la **section 1.3.1**. La membrane des LDL peut subir plusieurs modifications chimiques (acétylation ou oxydation) qui sont à l'origine de certaines complications vasculaires. Les HDL, connus comme étant le « bon cholestérol » dans le langage courant, sont les particules les plus denses de la famille des lipoprotéines. En effet, elles ont pour principale fonction de capter l'excédent de cholestérol des tissus périphériques pour le retourner vers le foie (Rosenson *et al.*, 2012). Synthétisés par le foie et les intestins, les HDL participent aux échanges des lipides et des Apo avec les chylomicrons et les VLDL.

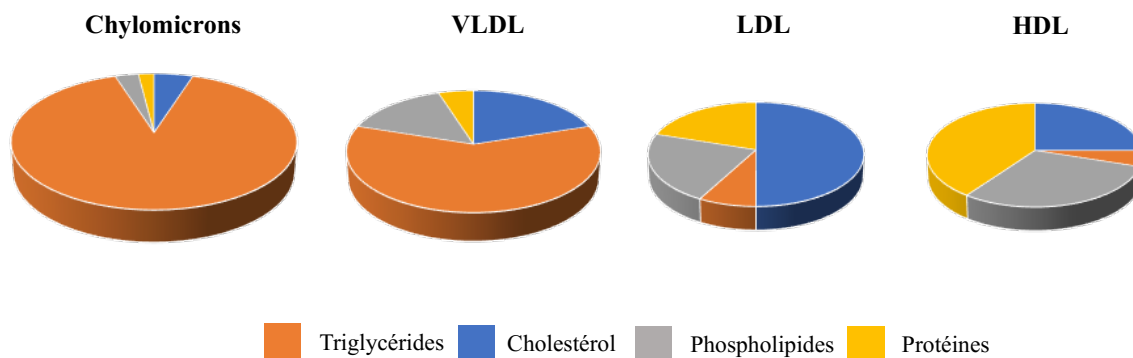


Figure 3: La composition des lipoprotéines en pourcentage

Les lipoprotéines de transport sont composées des triglycérides, du cholestérol, des phospholipides et des protéines avec des pourcentages variables. Les chylomicrons sont composés à 90% de TG, 5% de cholestérol, 3% de phospholipides et 2% de protéines. Les VLDL sont composées à 60%, 20%, 15% et 5% de TG, cholestérol, phospholipides et protéines respectivement. Les LDL sont composées à 8% de TG, 25% de cholestérol, 30% de phospholipides, 40% de protéines et les HDL à 5%, 25%, 30% et 40% de TG, cholestérol, phospholipides et protéines respectivement.

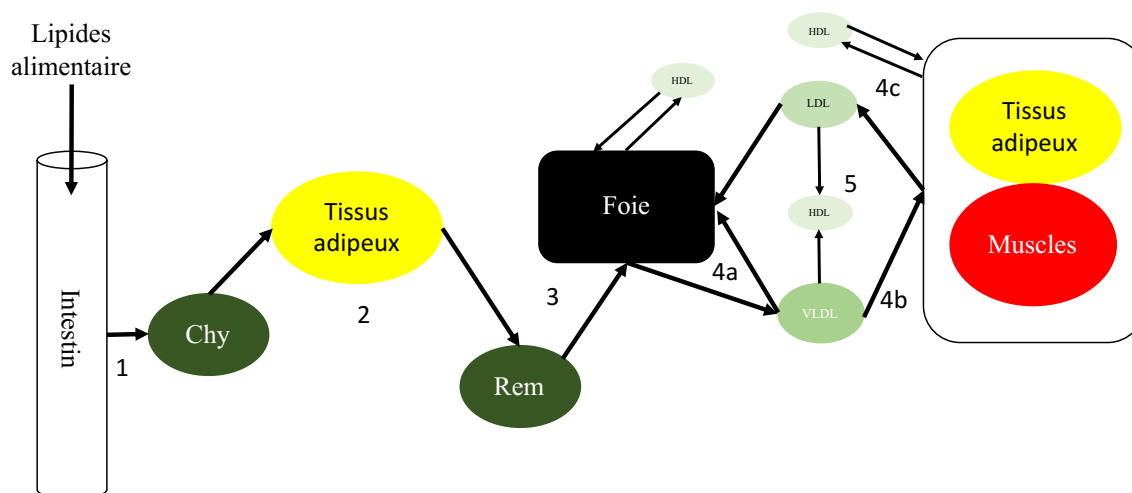


Figure 4 : Les lipoprotéines de transport

(1) Les lipides alimentaires traversent la barrière intestinale par les érythrocytes dans les chylomicrons (Chy). (2) Une fois passée la circulation sanguine ces derniers libèrent une

partie de leur contenu dans les tissus adipeux (2) et sortent sous forme de chylomicron remnants (Rem) en direction du foie (3). Le foie produit les VLDL (4a) qui libèrent les lipides qu'ils contiennent vers les tissus adipeux et les muscles (4b) pour se transformer en LDL (4c). L'excès de VLDL peut également se recycler vers le foie. Les HDL ont pour but de recycler le cholestérol et les triglycérides excédentaires provenant des LDL, des VLDL et des tissus (5).

1.2.4. Les formes de la dyslipidémie

La dyslipidémie est un phénomène qui se définit comme étant une modification anormale du niveau de lipides en circulation (Couvert *et al.*, 2010). Il s'agit plus précisément d'un niveau anormalement élevé de cholestérol total, de triglycérides ou de LDL en comparaison avec un niveau faible de HDL. Ce phénomène peut entraîner de nombreuses complications cardiovasculaires et peut être causé par de mauvaises habitudes de vie (alimentation riche en gras et sédentarité), par certaines anomalies génétiques héréditaires et par certains désordres métaboliques ou endocriniens. Par exemple, le diabète, l'hyperthyroïdie ou encore les maladies rénales chroniques sont souvent associés à certaines formes de dyslipidémie chez les patients, et par ce fait même, au risque de développer certaines complications coronariennes (West *et al.*, 1983 ; Howard *et al.*, 2000 ; Schofield *et al.* 2016). Le terme dyslipidémie rassemble l'hyper/hypocholestérolémie, l'hyper/hypotriglycéridémie et l'hyper/hypolipoprotéïnémie correspondant à une élévation ou une diminution importante du taux de cholestérol ou de TG ou des deux respectivement, mais aussi du niveau de lipoprotéines. Des mutations génétiques, retrouvées chez certains individus, entraînent un ralentissement ou une accélération du métabolisme des lipides. L'hypobêtalipoprotéïnémie, par exemple, est provoquée par une erreur dans le gène codant pour l'ApoB. Dans ce cas, les cellules intestinales ne peuvent pas emballer les lipides dans les vésicules, ce qui entraîne une accumulation des lipides dans l'intestin et une diminution de la cholestérolémie sanguine (Couvert *et al.*, 2010). À l'opposé, l'hyperbêtalipoprotéïnémie est une maladie héréditaire provoquant une importante hypercholestérolémie chez les individus d'une même famille. Ces derniers présentent des niveaux normaux de triglycérides, mais un niveau important de cholestérol total. La

dyslipidémie ne provoque pas de symptômes particuliers, mais est à l'origine d'importantes complications vasculaires. L'athérosclérose représente la principale conséquence des différentes formes de dyslipidémies et constituera le principal sujet de discussion dans la prochaine section sur les maladies cardiovasculaires.

1.3. Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires rassemblent les pathologies ciblant le cœur et le système circulatoire. L'Organisation mondiale de la santé a classé ce groupe de maladies comme étant la première cause de décès au monde. Vers la fin des années 1940 aux États-Unis, l'étude Framingham a été amorcée afin de mieux comprendre les différentes causes liées aux maladies cardiovasculaires (Dawber *et al.*, 1957). Elle a permis d'associer notamment l'hypertension artérielle, la dyslipidémie, les mauvaises habitudes alimentaires avec de nombreuses complications cardiovasculaires. À ce jour, cette étude regroupe plusieurs cohortes sur près de trois générations de patients et l'hérédité devient un nouveau paramètre d'investigation. En effet, certains désordres métaboliques et certaines modifications génétiques ou épigénétiques ont été identifiés dans les dernières décennies et mis en corrélation avec certaines pathologies cardiovasculaires (Andersson *et al.*, 2019 ; Blüher *et al.*, 2019). En clinique, la dyslipidémie se diagnostique à partir de plusieurs tests sanguins faits chez les personnes de plus de 40 ans ayant des antécédents d'hypertension, une forme de diabète, une forme de dyslipidémie héréditaire, une atteinte rénale, une maladie inflammatoire chronique et chez les personnes présentant un IMC supérieur à 30 kg/m². Une personne présentant une concentration de cholestérol total (CT) supérieure à 5 mmol/L et un rapport CT/HDL supérieur ou égal à 6 accroît le risque de complications vasculaires et nécessite une prise en charge médicale. Afin de mieux comprendre les pathologies associées au système cardiovasculaire, quelques exemples vont être décrits dans les prochaines sections.

1.3.1. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique, se traduisant par une accumulation de lipides et de cellules inflammatoires à l'intérieur de l'espace sous-endothélial des vaisseaux (Torres *et al.*, 2015). Ce projet s'intéressant exclusivement aux macrovaisseaux, l'aorte sera donc l'exemple utilisé pour décrire cette maladie. Lors d'un stade avancé de la pathologie, de nombreuses complications vasculaires peuvent apparaître comme étant des accidents cérébrovasculaires, l'ischémie du myocarde et des membres inférieures. Les principales causes sont le tabagisme, une diète riche en gras et le manque d'activité physique. La physiopathologie de l'athérosclérose est un processus long et complexe menant à la formation de « bouchons de gras » appelée plaques athérosclérotiques. Les conditions d'hypercholestérolémies, mentionnées précédemment, entraînent une augmentation de l'infiltration des LDL à l'intérieur des artères. Une fois passée la barrière endothéliale, ces lipoprotéines peuvent subir plusieurs modifications aux niveaux membranaires, l'oxydation et l'acétylation en sont des exemples. En effet, des groupes de recherches ont démontré que l'oxydation des LDL (oxLDL) participe à l'activation des cellules endothéliales (Steinbrecher *et al.*, 1984 ; Steinberg *et al.*, 2009). Le dysfonctionnement endothélial a été décrit pour la première fois par le chercheur Rudolph Virchow en 1856, lorsque ce dernier a observé qu'une accumulation de lipides localisés corrélait avec une augmentation de la perméabilité membranaire. Près d'un siècle plus tard, ce sont les chercheurs Russell Ross et John A. Glomset qui émettent l'hypothèse « *Response to Injury Hypothesis* ». Cette hypothèse explique que des lésions artérielles peuvent être provoquées par certaines substances nocives à l'extérieur et à l'intérieur des vaisseaux (cholestérol, tabac, cholestérol oxydé, hyperglycémie...), entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité de ces derniers et favorisant le processus d'athérosclérose (Steinberg *et al.*, 2009). Les études réalisées par la suite ont démontré que le dysfonctionnement endothélial se traduit majoritairement par une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, de la sécrétion de molécules chemoattractantes, de la production de monoxyde d'azote (NO) et d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) (Nakashima *et al.*, 1998 ; Dawson *et al.*, 1999 ; Ley *et al.*, 2001 ; Barlic *et al.*, 2007). L'augmentation de la production de NO cause l'inhibition de facteur de transcription jouant

un rôle dans la régulation de l'expression des molécules d'adhésion et de certaines sélectines (Neumann *et al.*, 2000).

Le dysfonctionnement endothélial a pour conséquence d'augmenter le recrutement et l'adhésion des cellules immunes vers la barrière vasculaire. Important membre du système inné, les monocytes sont recrutés en premier et infiltrés dans l'espace sous-endothélial. Une fois différenciés en macrophage, ils ont pour rôle de phagocyter les oxLDL afin de nettoyer les vaisseaux du cholestérol accumulé. Les macrophages expriment de nombreux récepteurs de type *scavenger* pour permettre la phagocytose des microorganismes et également des LDL. Les récepteurs comme CD36, LOX-1 ou encore SR-A participent à la phagocytose des LDL et à la progression de l'athérosclérose (Rader *et al.*, 2005). Lors de la phagocytose des lipoprotéines, ces dernières sont dégradées à l'intérieur des lysosomes et le cholestérol est accumulé sous forme de gouttelette lipidique à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Ce phénomène est favorisé par l'activité enzymatique des LDL et par leur modification structurale. Lors de cette étape, les macrophages sont transformés en cellules spumeuses. De nombreuses études ont montré qu'une délétion du récepteur SR-A dans les macrophages ou dans un modèle de souris entraîne une diminution de la formation des cellules spumeuses (Suzuki *et al.*, 1997 ; Sakaguchi *et al.*, 1998 ; Rader *et al.*, 2005).

Certains mécanismes sont utilisés par les macrophages pour éliminer le cholestérol qu'ils ont accumulé ; on parle alors d'efflux de cholestérol. Une fois les LDL ou les oxLDL phagocytées, elles sont par la suite fusionnées dans les lysosomes pour libérer le cholestérol dans le cytosol. Ici, le cholestérol libre peut-être incorporé à l'intérieur des autophagosomes et expulsé à l'extérieur des macrophages. La forme estérifiée du cholestérol peut être dé-estérifiée et relâchée directement dans la circulation par diffusion à travers la membrane ou bien emmagasinée à l'intérieur des HDL.

Les cellules musculaires lisses (CML), composant la couche du média, sont activées et prolifèrent vers l'endothélium où elles sécrètent plusieurs composants de la matrice extracellulaire afin de former un cap fibreux qui sert à protéger les plaques de la rupture et de diminuer l'effet de fibrose. Cependant, une rupture du cap est possible, libérant l'ensemble du contenu des plaques dans la circulation, ce qui déclenche le processus de coagulation. La rupture de la plaque peut être expliquée par l'inhibition de la synthèse de collagène des CML par certains médiateurs proinflammatoires (Libby *et al.*, 1988), mais

aussi par la dégradation du cap fibreux par les métalloprotéinases 4 (Vacek *et al.*, 2015). La formation de caillots est à l'origine de nombreuses complications cardiovasculaires liées à l'athérosclérose comme les accidents cérébrovasculaires, les attaques cardiaques, mais également l'ischémie des membres inférieurs. La **figure 5** met en image la pathophysiologie de l'athérosclérose.

Des décennies de recherche ont permis de mettre en place certaines solutions pour diminuer la formation des plaques athérosclérotiques en régulant les niveaux de cholestérol. La statine est un inhibiteur de l'hydroxyméthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) qui est une enzyme clé dans la synthèse du cholestérol endogène et fait partie des traitements les plus utilisés pour traiter la dyslipidémie. Il a été démontré que la statine entraîne une diminution du développement des maladies coronariennes chez les patients atteints d'hypercholestérolémie. Plus récemment, des inhibiteurs de la proprotéine convertase subtilisin-kexin de type 9 (PCSK9), qui permettent la réduction du niveau de LDL en circulation, ont été développés. Ils ont pour effet de diminuer l'activité de PCSK9 qui est une protéase hépatique qui induit la destruction des récepteurs LDL (Palasubramaniam *et al.*, 2019). Pour diminuer le processus athérogène, la baisse de la cholestérolémie est une étape importante, mais la diminution de l'inflammation a également son importance.

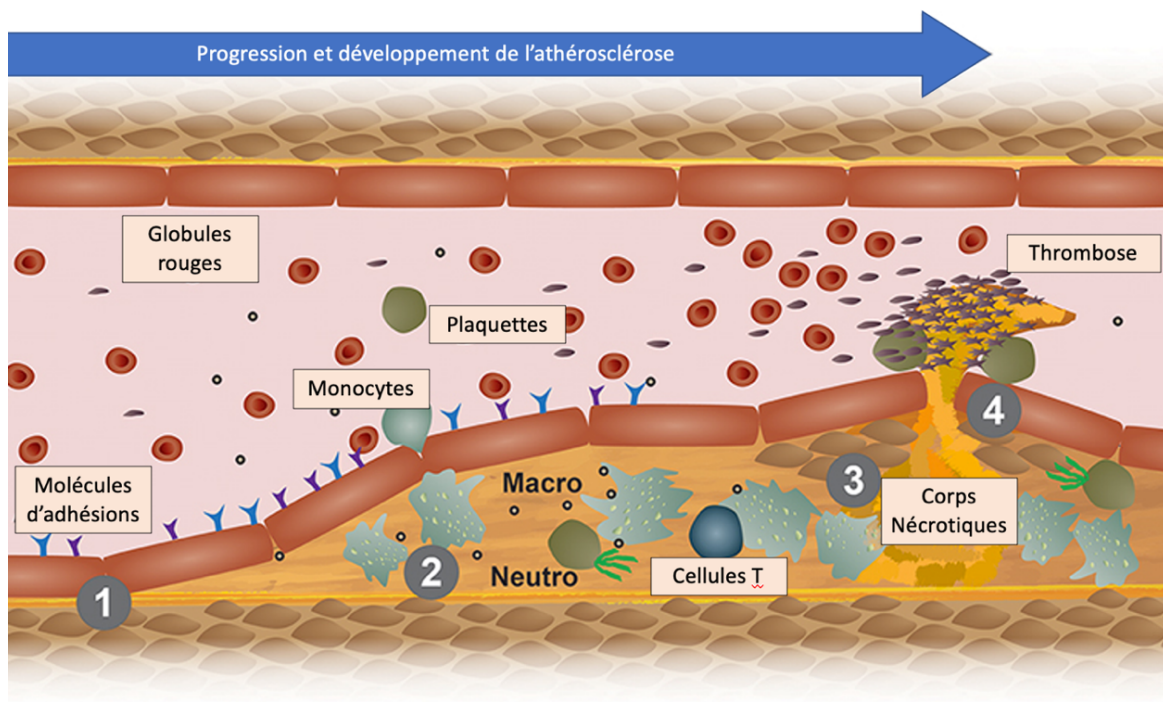


Figure 5 : La pathophysiologie de l'athérosclérose

Les conditions de dyslipidémie entraînent l'infiltration du cholestérol à l'intérieur de l'espace sous-endothélial, ce qui favorise l'expression des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium vasculaire (1). Cette étape favorise l'infiltration des monocytes circulant à l'intérieur des vaisseaux (2) qui, en se différenciant en macrophages, forment des cellules spumeuses. Sous l'action des cellules T, le processus inflammatoire s'amplifie pour former des corps nécrotiques (3). La rupture de l'endothélium entraîne la formation de caillot (4) menant à de nombreuses complications cardiovasculaires (Adapté de C. Dawson *et al.*, 1999).

1.3.2. La maladie des artères périphériques

La maladie des artères périphériques (MAP) fait partie des anomalies macrovasculaires provoquées par le développement des plaques athérosclérotiques au niveau des membres inférieurs. C'est une pathologie retrouvée principalement chez les individus de plus de 50 ans dont la prévalence augmente avec l'âge (Criqui *et al.*, 2014). Comme pour

l'athérosclérose, le tabagisme, la sédentarité ou les mauvaises habitudes alimentaires sont les principales causes de la maladie des artères périphériques. D'autres pathologies comme l'hypertension artérielle, la dyslipidémie ou le diabète augmentent le risque de développer de telles complications ciblant les membres inférieurs. Comme mentionné précédemment, l'athérosclérose provoque le rétrécissement de la lumière artérielle, diminuant ainsi l'apport sanguin ou ischémie. Dans le cas de la MAP, les nombreuses plaques formées vers les membres inférieurs (principalement les jambes) entraînent une ischémie de ces derniers, ce qui a pour conséquence de diminuer l'apport en oxygène dans les muscles. Chez la plupart des personnes saines, le processus d'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, vise à contourner ce problème et permettre ainsi l'irrigation de la jambe. Chez les personnes diabétiques par exemple, le phénomène d'angiogenèse est altéré ce qui mène, dans la plupart des cas, à la nécrose des membres et à leur amputation. Pratiquer une activité physique régulière, combinée avec une diète saine, demeure la principale recommandation des professionnels de la santé.

1.4. La physiologie du système cardiovasculaire

1.4.1. Généralité

Le système cardiovasculaire est composé du cœur et de l'ensemble du réseau vasculaire, qui rassemble les vaisseaux sanguins et lymphatiques. La circulation sanguine prend son origine à la sortie du ventricule gauche où le sang est chargé en oxygène. Lors de la systole, la pression à l'intérieur du ventricule est élevée, ce qui entraîne l'ouverture de la valve aortique et permet la propulsion du sang à l'intérieur de l'aorte. Du cœur vers les tissus, les artères se rétrécissent et se subdivisent en plusieurs artérioles qui alimentent les cellules de leur contenu (oxygène et nutriments). À la sortie des cellules, les veinules transportent l'ensemble des déchets métaboliques et le dioxyde de carbone vers le cœur pour être relâchées vers l'extérieur. Ce cheminement est favorisé par la pression artérielle, le débit sanguin et les conditions physiologiques de l'organisme. Au niveau tissulaire, les artères sont composées de trois différentes sous-couches entourant la lumière artérielle ou le lumen. La première couche qui est en contact direct avec la circulation sanguine est l'intima

qui est composée principalement des cellules endothéliales, d'une membrane basale et des fibres d'élastines. La deuxième sous-couche, le média, est composée majoritairement des cellules musculaires lisses et la dernière sous-couche est appelée l'adventice qui se compose des fibres de collagènes et de tissus élastiques permettant de maintenir l'intégrité des vaisseaux. Un schéma des trois sous-couches composant l'artère est présenté à la **Figure 6**.

Dans un contexte pathologique, les CML participent à la synthèse de molécules inflammatoires, à la synthèse des composés de la matrice extracellulaire et aux processus de vasodilatation/vasoconstriction. Certains stress, comme la déshydratation, entraînent la sécrétion d'hormones et de différents médiateurs capables d'influencer la vasodilatation ou la vasoconstriction des vaisseaux et de réguler la pression. Un autre composant important du système circulatoire est le système lymphatique qui assure le transport de la lymphe. Cette dernière est composée principalement de liquide interstitiel, des lipides provenant du foie et des intestins, mais également des globules blancs (essentiellement des lymphocytes). Le réseau lymphatique est très vaste et est constitué de nombreux vaisseaux pouvant former des nœuds permettant la rencontre des cellules immunes avec les cellules étrangères. Ces nœuds permettent l'activation des cellules immunitaires et aussi de créer des liens entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif qui seront décrits plus tard.

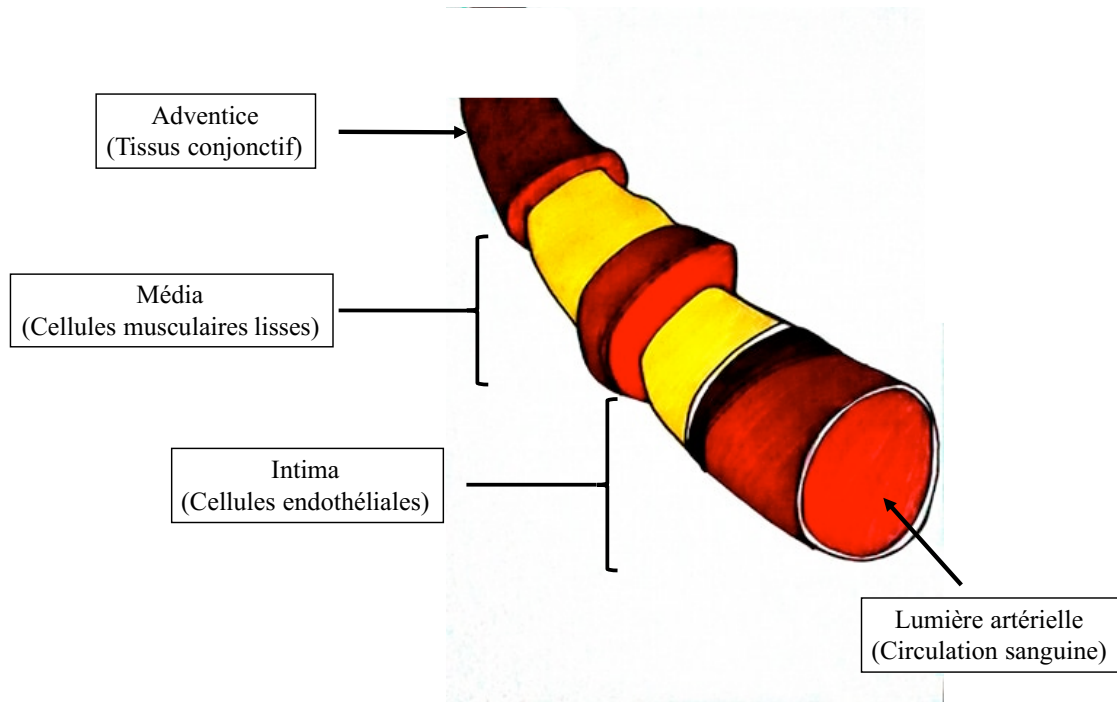


Figure 6 : La structure d'une artère

Les artères sont composées de trois principales sous-couches. L'intima est la première couche et est la plus proche de la circulation sanguine. Elle est composée principalement de cellules endothéliales permettant un échange contrôlé des éléments sanguins vers les tissus. La deuxième est constituée principalement de cellules musculaires lisses qui permettent la contraction musculaire et est appelée le média. L'intégrité de l'artère est assurée par l'adventice.

1.4.2. L'anatomie de l'aorte

L'aorte est la plus grosse artère de l'organisme qui s'étend de la sortie du ventricule gauche jusqu'aux artères iliaques situées dans la région abdominale. Son principal rôle est de transporter le sang oxygéné, les nutriments et les composants immunitaires vers l'ensemble de l'organisme. De par sa longueur, l'aorte est divisée en plusieurs parties : l'aorte ascendante, la crosse aortique, l'aorte descendante (ou thoracique) et l'aorte abdominale. L'aorte ascendante est séparée du ventricule gauche par la valve aortique qui, en s'ouvrant, libère une grande quantité de sang provoquant une forte élévation de la pression. Ce

changement de pression est compensé par l'élasticité de cette section et par son large diamètre. L'aorte ascendante est composée des sinus aortiques droit et gauche donnant naissance aux artères coronariennes qui entourent le myocarde. La crosse aortique, qui succède à l'aorte ascendante, possède plusieurs bifurcations : l'artère brachiocéphalique (BCA), l'artère carotide commune gauche et l'artère subclavière gauche. Ces dernières servent principalement à l'irrigation du cou et des bras. L'aorte thoracique s'étend le long de la colonne vertébrale jusqu'à la vertèbre thoracique T12. La dernière section est l'aorte abdominale qui se termine par sa division en artères iliaques communes situées à la hauteur de la quatrième lombaire (voir **Figure 7**).

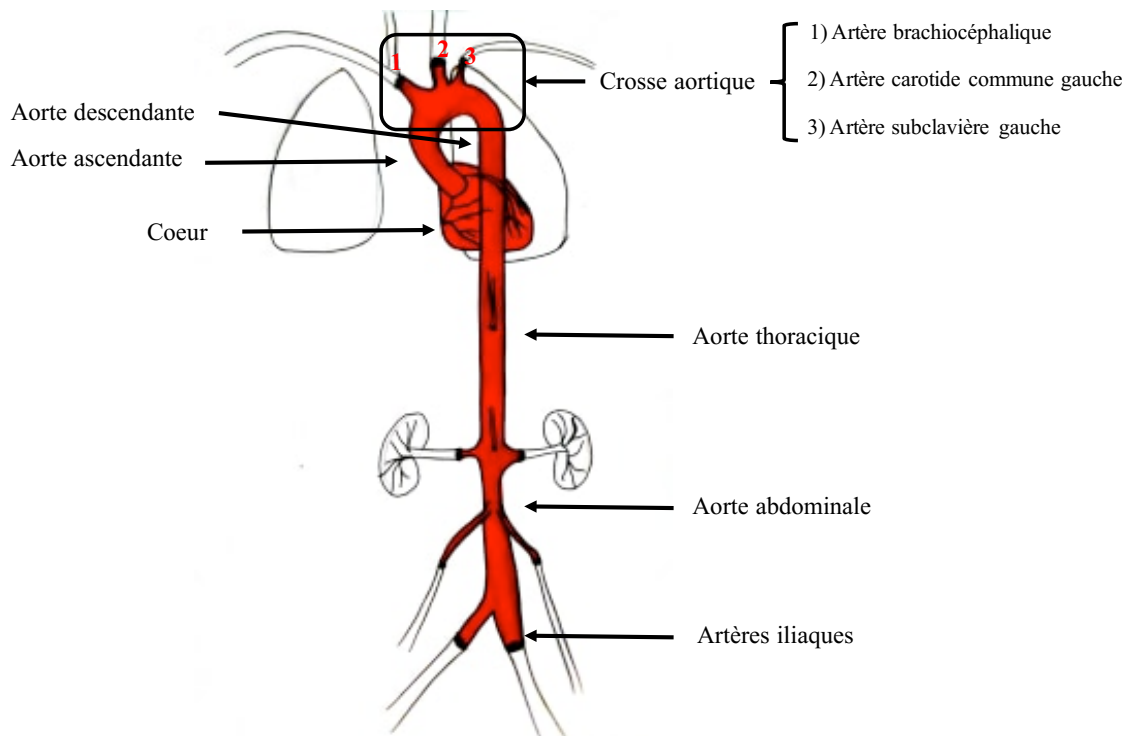


Figure 7 : L'anatomie de l'aorte

L'aorte quitte le ventricule gauche vers l'aorte ascendante puis la crosse aortique. Cette dernière est composée des artères brachiocéphalique (1), de la carotide commune gauche (2) et l'artère subclavière gauche (3). L'aorte thoracique s'étend jusqu'aux reins pour laisser place à l'aorte abdominale qui se sépare en deux au niveau des artères iliaques.

1.5. La physiologie du système immunitaire

1.5.1. Généralité

Le système immunitaire a pour principal objectif de distinguer les cellules du soi et du non-soi afin de combattre les attaques provenant de l'extérieur de l'organisme. Pour ce faire, plusieurs mécanismes de défense sont utilisés par l'ensemble des cellules de ce système pour mieux combattre les microorganismes. Elles peuvent sécréter une grande diversité de molécules inflammatoires, utilisées pour attirer et activer d'autres cellules immunitaires afin de détruire les cellules nuisibles, d'induire la réparation tissulaire ou encore de ralentir le processus inflammatoire une fois la menace éloignée. Les cellules du système immunitaire sont produites à l'intérieur des organes lymphoïdes primaires comme la moelle osseuse ou le thymus. D'autres organes comme la rate, les ganglions lymphatiques, les amygdales, l'appendice ou les plaques de Peyer (cellules intestinales) servent à la maturation des cellules immunitaires, mais ce sont aussi des lieux de rencontre entre les cellules immunes et les microorganismes étrangers. Le processus inflammatoire s'orchestre en plusieurs étapes très complexes, mais qui seront simplifiées dans les prochaines lignes. Dans le cas d'une infection bactérienne, les cellules touchées vont produire des molécules chemoattractantes afin de diriger les cellules immunitaires vers le lieu d'infection : c'est l'étape de chemotaxie. Par la suite, les cellules immunitaires quittent la circulation pour se diriger à l'intérieur de la zone infectée par l'étape d'extravasation afin d'être activées par des molécules appelées cytokines. Pour finir, les cellules vont amorcer l'étape de résolution en déclenchant plusieurs mécanismes de défense et réduire le processus inflammatoire. De par la grande variété des dangers situés à l'extérieur et à l'intérieur de l'organisme, de nombreux acteurs inflammatoires sont mis à contribution et peuvent être regroupés dans deux grandes familles, soit le système inné et le système adaptatif.

1.5.2. Le système immunitaire inné

Le système immunitaire inné est composé des cellules myéloïdes regroupant les neutrophiles, les basophiles, les monocytes/macrophages/cellules dendritiques et les éosinophiles. Ce système agit en premier au lieu d'infection et participe à l'activation des cellules du système adaptatif par la présentation d'antigène. Les monocytes/macrophages étant les principaux acteurs de l'initiation de la formation des plaques athérosclérotiques, les prochaines sections aborderont essentiellement ces types cellulaires. Les monocytes sont des cellules phagocytaires mononuclées produites principalement par la moelle osseuse. Elles sont constituées de nombreux granules à l'intérieur de leur cytoplasme enfermant une importante activité enzymatique utilisée pour la lutte contre les microorganismes.

Ces phagocytes sont des cellules mobiles qui possèdent une grande quantité de récepteurs et de glycoprotéines membranaires utilisés pour l'adhésion cellulaire, leur mobilité, leur prolifération, leur différenciation, leur caractérisation, etc. Il existe deux grandes familles de monocytes en circulation qui peuvent se distinguer par certains marqueurs de surfaces. Chez la souris, les monocytes exprimant fortement le marqueur de granulocyte de type 1 (Gr-1) font partie de la famille des monocytes « classiques » en comparaison avec les monocytes « non classiques » qui n'exprimeront pas ou peu cette glycoprotéine (Woollard *et al.*, 2010). Ces deux sous-classes ne se distinguent pas seulement par l'expression des marqueurs de surface spécifiques, mais également par leur rôle dans le processus inflammatoire. En effet, les monocytes classiques ou Gr-1⁺ sont associés à une activité pro-inflammatoire en comparaison avec les monocytes Gr-1⁻ qui sont associés à une activité anti-inflammatoire (Woollard *et al.*, 2010). Une étude a démontré que l'hypercholestérolémie provoque une augmentation de la prolifération des cellules Gr-1⁺ en circulation, ce qui favorise la formation des plaques athérosclérotiques chez le modèle de souris *Apoe*^{-/-} (Swirski *et al.*, 2007). À ce jour, le rôle des monocytes anti-inflammatoires Gr-1⁻ sur le processus d'athérosclérose n'a pas été encore clarifié. Les monocytes expriment également une grande diversité d'intégrines comme le *very late antigen 4* (VLA-4) et le *lymphocyte function associated antigen 1* (LFA-1), qui permettent la liaison avec les molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales comme la

vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1) et l'*intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) respectivement (Galkina *et al.*, 2007). En 1998, le groupe de recherche du docteur Shipesh Patel, à l'aide d'un marquage spécifique des macrophages des souris *Apoe*^{-/-} et d'une injection d'anticorps anti-VLA-4 et d'anti-ICAM-1, a réussi à démontrer l'importance de ces deux molécules dans l'infiltration des monocytes à l'intérieur de l'aorte. En effet, l'inhibition de ces intégrines entraîne une diminution entre 65 et 75 % de l'infiltration des monocytes à l'intérieur de l'aorte des groupes de souris *Apoe*^{-/-} (Patel *et al.*, 1998).

À la suite de l'étape d'extravasation, les monocytes se différencient en macrophages sous l'action de différents facteurs comme les *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) ou les *granulocytes/macrophages colony stimulating factor* (GM-CSF). Ces cellules matures ont pour rôles de phagocyter les microorganismes extérieurs ou les débris cellulaires, de réparer les lésions tissulaires et permettent également la présentation de l'antigène aux cellules du système adaptatif. Comme mentionné précédemment, les macrophages ont également la capacité de phagocyter et digérer les LDL retrouvées à l'intérieur des tissus et les artères.

L'étape d'activation des macrophages est un processus complexe dépendant de l'environnement inflammatoire dans lequel ils se trouvent. Ce mécanisme est représenté dans la **Figure 8**. L'activation de type « classique » des macrophages, ou macrophage M1, est provoquée par des cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron gamma (IFN γ), l'interleukine 1 alpha (IL-1 α), IL-1 β ou le *tumoral necrosis factor* alpha (TNF α) et ils participent à la production de cytokines pro-inflammatoires, la production de monoxyde d'azote, la production des radicaux libres et la présentation de l'antigène (Gordon *et al.*, 2014). Dans le cas de l'athérosclérose, les macrophages M1 amplifient la modification des LDL, l'activation des cellules endothéliales et augmentent la formation des cellules spumeuses (Lee *et al.*, 2018). L'activation de type « alternative » des macrophages, ou macrophages M2, est médiée principalement par les cytokines IL-4 et l'IL-13, qui jouent un rôle anti-inflammatoire en participant à la réparation tissulaire et à l'atténuation de l'inflammation (Gordon *et al.*, 2014). Certains marqueurs des M2 ont été répertoriés comme l'Arginase 1 (Arg 1), la molécule résistine (Fizz 1), la chitinase 3 (Ym-1) ou le récepteur du mannose (MR), influençant négativement la production de NO notamment (Raes *et al.*, 2002). En 2016, une étude menée par la professeure Monica de Gaetano a

démontré, chez des patients atteints d'une maladie coronarienne, que les macrophages M2 participent à la stabilité des plaques formées à l'intérieur des artères (de Gaetano *et al.*, 2016). Dans le cas de l'athérosclérose, les macrophages M2 sont capables de capter plus de cholestérol que les macrophages M1, mais participent davantage à leur excrétion en dehors de l'aorte (Bi *et al.*, 2019). Sous l'influence de l'IL-10, les macrophages M1 peuvent changer leurs phénotypes pour le profil M2 afin d'atténuer le processus inflammatoire.

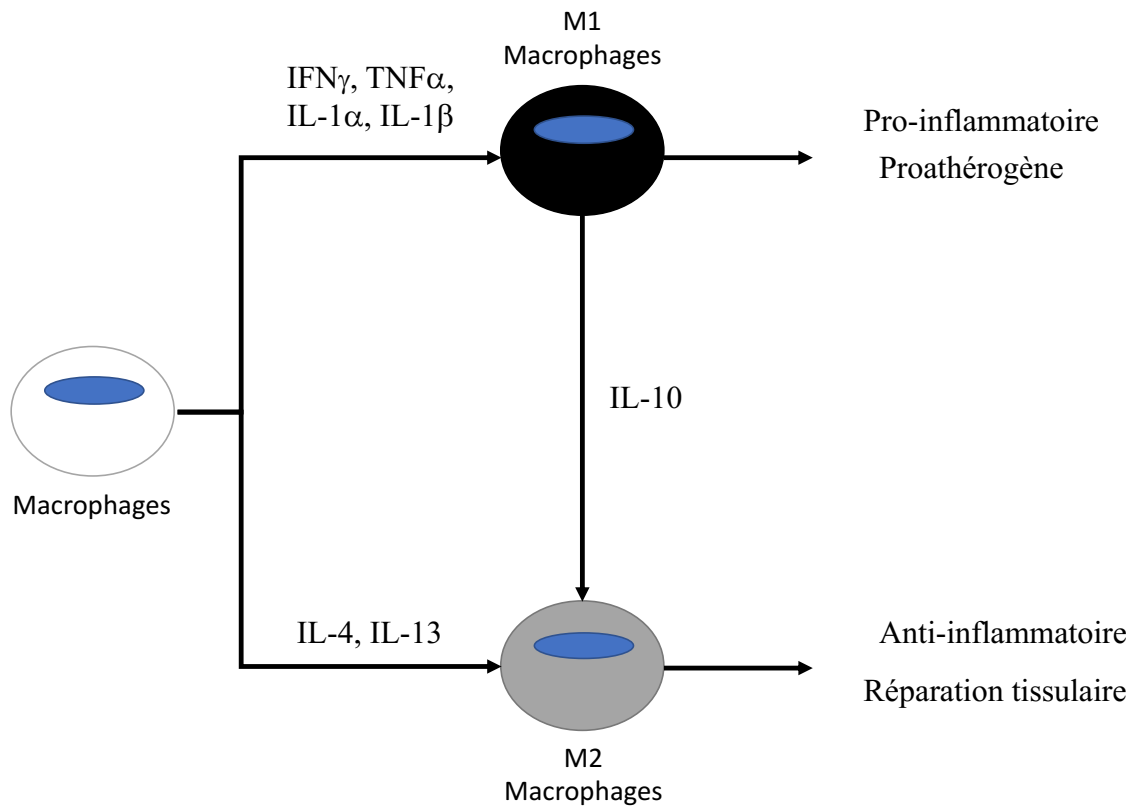


Figure 8 : L'activation des macrophages

Différenciés à partir des monocytes, les macrophages peuvent être activés en macrophages M1 ayant un effet pro-inflammatoire sous l'influence de plusieurs cytokines comme l'IFN γ et le TNF α . Les cytokines IL-4 et IL-13 favorisent l'activation des macrophages M2 qui ont une fonction anti-inflammatoire et favorisent la réparation tissulaire. L'IL-10 incite les M1 à adopter un profil M2 afin de résoudre l'inflammation

1.5.3. Le système immunitaire adaptatif

Le système adaptatif est composé des cellules lymphoïdes comme les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules tueuses naturelles (NK). Ces dernières naissent dans le thymus ou dans la moelle osseuse avant d'être dirigées vers les organes lymphoïdes périphériques, où ils seront activés par la reconnaissance des antigènes présentés notamment par les macrophages. Cette rencontre permet l'activation et la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes auxiliaires (Th), cytotoxiques (Tc) et régulateurs (Treg) qui participent activement à la régulation de nombreuses fonctions immunitaires. Les lymphocytes Th se divisent en plusieurs sous-populations comme les Th1, les Th2, les Th9, les Th17 et les Th22, mais pour des raisons pratiques, seules les deux premières sous-unités et les Treg seront décrites.

Sous l'influence des cytokines pro-inflammatoires, comme IL-2 et IL-12, les lymphocytes T naïfs se différencient en Th1 qui se distinguent par l'expression de certains facteurs de transcriptions spécifiques comme T-bet, STAT1 (Luckheeram *et al.*, 2012) et l'expression de certains récepteurs aux chemokines comme le récepteur à motif CXC de type 3 (CXCR3) et le récepteur à motif CC de type 5 (CCR5) (Saigusa *et al.*, 2020). Les Th1 sont impliqués dans l'élimination des pathogènes, ainsi que dans le recrutement des cellules phagocytaires qui participent notamment à la progression de l'athérosclérose (Mallat *et al.*, 2009). En effet, les lymphocytes Th1 produisent de l'IFN γ , qui se trouve être un important acteur dans la formation des plaques athérosclérotiques, en participant notamment à l'initiation de l'inflammation et à la réduction de la prolifération des cellules musculaires lisses (Saigusa *et al.*, 2020).

Les cellules T naïves (Figure 9) peuvent aussi se différencier en lymphocytes Th2 par l'action des cytokines anti-inflammatoires comme IL-4 et IL-13 (Luckheeram *et al.*, 2012). Les Th2 sont sollicités pour combattre les parasites extracellulaires, pour la différenciation des lymphocytes B ainsi que dans certains mécanismes liés à l'asthme (Mallat *et al.*, 2009). Le rôle des lymphocytes Th2 dans l'athérosclérose n'a pas encore été clairement établi et reste un sujet à controverse (Saigusa *et al.*, 2020). En effet, un groupe de recherche a voulu étudier l'impact de la délétion d'IL-12 dans un modèle de souris *Apoe*^{-/-}. Cette délétion a

eu pour effet de diminuer l'infiltration des Th1, mais a augmenté l'infiltration des Th2, ce qui a eu pour effet de diminuer le processus athérogène (Huang *et al.*, 2019).

Afin de diminuer le processus inflammatoire, les lymphocytes T régulateurs sont impliqués dans le processus de réduction de l'athérosclérose (Mallat *et al.*, 2009 ; Saigusa *et al.*, 2020). Ils produisent certaines cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et le *transforming growth factor beta* (TGF β) qui jouent un rôle négatif dans la prolifération des cellules T pro-inflammatoires. Des études ont démontré qu'une diminution d'une de ces cytokines amplifie le pourcentage de dépôt lipidique à l'intérieur de l'aorte (Oslund *et al.*, 1999 ; Robertson *et al.*, 2003).

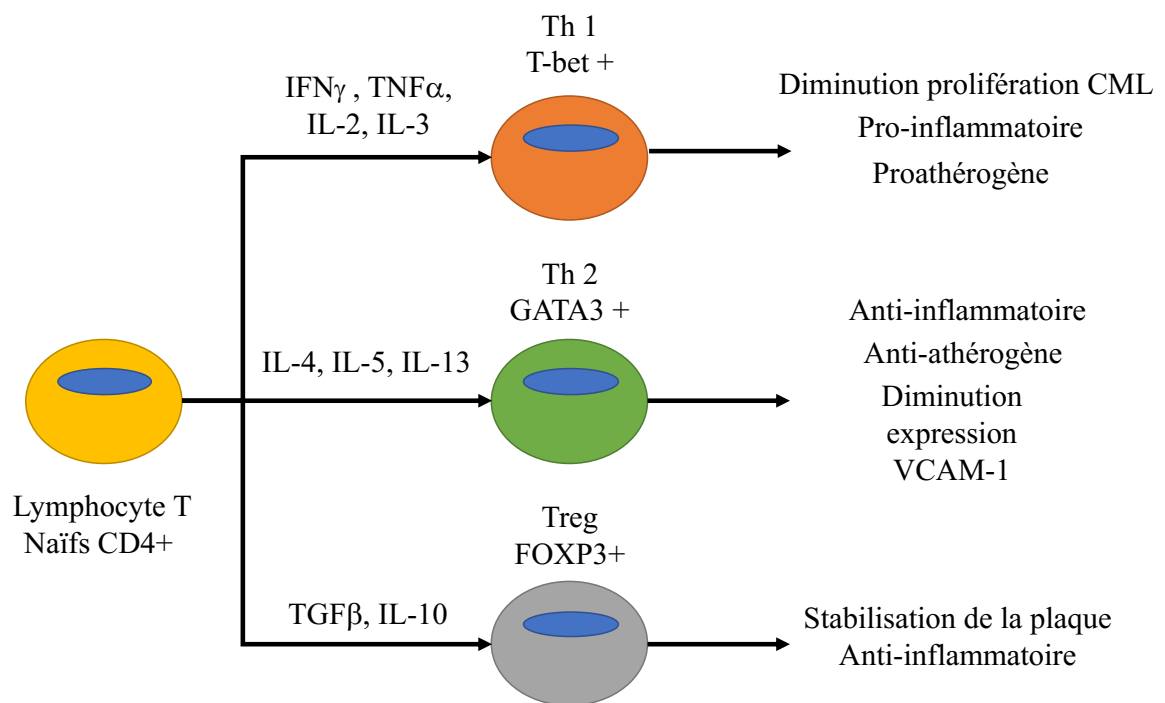


Figure 9 : La maturation des lymphocytes T CD4+ et leurs rôles dans l'athérosclérose

Les lymphocytes T auxiliaires naïfs, sous l'action de nombreuses cytokines, se différencient en des lymphocytes Th1, Th2 ou Treg. L'effet d'IL-2, IL-3, $\text{TNF}\alpha$ et l' $\text{IFN}\gamma$ entraîne l'activation des Th1 qui participe à la prolifération des cellules musculaires lisses, et au développement des plaques athérosclérotiques. Les lymphocytes Th2 sont activés par

les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 et favorisent le processus anti-inflammatoire. L'IL-10 et le TGF β entraînent l'activation des lymphocytes Treg qui favorisent la stabilité de la plaque et participent à la réduction des plaques.

1.6. Les facteurs inflammatoires

1.6.1. Les chemokines

Les récepteurs aux chemokines sont pour la plupart des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ce sont des récepteurs composés de sept domaines transmembranaires avec un domaine N-terminal permettant la liaison du ligand au récepteur et un domaine C-terminal intracellulaire permettant l'activation des voies de signalisation, la dégradation du récepteur et son recyclage. La liaison du ligand entraîne un changement de conformation du récepteur et permet le recrutement de la protéine hétérotrimérique G. Une molécule de GDP liée à la sous-unité G est remplacée par une molécule de GTP afin de permettre sa liaison au récepteur et sa dissociation des deux autres sous-unités G β/γ et G α . Une fois dissociées, ces sous-unités activent de nombreuses voies de signalisation. Le recrutement de la β -arrestine en C-terminal du récepteur entraîne l'internalisation du récepteur dans le cytosol où il sera dégradé, recyclé à la membrane ou activera d'autres voies de signalisation cellulaires. L'activation des récepteurs aux chemokines active l'étape de chemotaxie, qui consiste à attirer les cellules immunes vers le site d'infection.

Les chemokines sont des molécules de petite taille, comprise entre 8 kDa à 12 kDa, qui sont regroupées en 4 familles (C, CC, CXC, CX3C) et réparties en fonction du nombre et de la localisation des résidus cystéines en N-terminal (Deshmane *et al.*, 2009). Cette région est importante pour la liaison au récepteur et pour l'activation des voies de signalisation intracellulaires. Lors de l'initiation de l'inflammation, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires induisent la sécrétion de chemokines et ainsi forment un gradient chimotactique pour permettre la migration des cellules vers le lieu d'infection. Cette étape a également pour rôle de diriger les leucocytes vers les organes lymphoïdes comme la moelle osseuse, les ganglions, la rate ou le thymus pour maintenir l'homéostasie du système immunitaire. Ces étapes essentielles font également partie d'un équilibre fragile

qui, lorsqu'il est perturbé, provoque de nombreuses pathologies inflammatoires. Depuis plusieurs années, certaines recherches sont réalisées afin de mieux comprendre les mécanismes chemotactiques. Parmi les principaux marqueurs impliqués dans l'attraction des cellules myéloïdes, la protéine chemoattractante des monocytes 1 (MCP-1 ou CCL2) fait partie des molécules les plus importantes. Découverte en 1983, cette molécule est un membre de la famille des chemokines de type C-C et participe fortement à l'attraction des monocytes vers l'endothélium vasculaire. Le RCPG de MCP-1 possède deux variants, soit CCR2A et CCR2B, qui se distinguent entre eux par leurs différences structurales en C-terminal. MCP-1 est associé à une activité pro-inflammatoire en favorisant la chemotaxie ainsi que la présentation de l'antigène, mais possède également un rôle anti-inflammatoire impliquant le recrutement des lymphocytes T régulateurs. Étudiés dans un premier temps dans les maladies virales comme l'infection au VIH, MCP-1 et son récepteur ont très vite suscité l'attention dans l'étude des maladies cardiovasculaires. Des modèles de souris *Apoe^{-/-}Ccr2^{-/-}* ou *Apoe^{-/-}Ccl2^{-/-}* ont permis de mieux comprendre le rôle de cette chemokine dans le processus athérogène. Il a été démontré que le groupe de souris *Apoe^{-/-}Ccr2^{-/-}* présentait moins de plaques athérosclérotiques que les souris possédant CCR2, ce qui s'explique notamment par une diminution de l'infiltration des monocytes à l'intérieur de l'aorte et une diminution des lésions artérielles (Boring *et al.*, 1998). Dans la même famille de chemokine, CCL5 ou RANTES participent également au recrutement des monocytes en se liant au récepteur CCR5. Sa découverte, à la fin des années 1990, a été fortement remarquée, car ce dernier est un corécepteur pour le virus VIH. CCR5 est également un récepteur pour les ligands CCL3 ou CCL4. De nombreuses recherches ont été effectuées sur le rôle de RANTES dans le cancer du sein, mais également dans les maladies cardiovasculaires. Des études ont démontré que les patients exprimant un variant de CCR5, qui entraîne l'inactivation de ce dernier, présentent un niveau élevé de HDL et un niveau plus faible de triglycéride en circulation comparativement aux individus ne l'exprimant pas (Hyde *et al.*, 2010). Comme MCP-1, des antagonistes de CCR5 ou une délétion complète de ce récepteur provoquent une diminution de l'infiltration des monocytes et de la formation des plaques athérosclérotiques chez la souris (Jones *et al.*, 2011). Seul représentant de la famille des chemokines CX3C, la fractalkine ou CX3CL1 est également un élément important dans le processus inflammatoire. En comparaison avec les molécules

décrites précédemment, CX3CL1 peut être retrouvée sous forme soluble en circulation, mais aussi à la surface des membranes. Ces deux formes de ligands permettent aussi bien la migration des leucocytes vers l'endothélium que leur adhésion. Cette chemokine possède un seul récepteur, nommé CX3CR1, exprimé à la surface des monocytes, des neurones, des cellules NK, des microgliales et certaines sous-population de lymphocytes T. Le niveau d'expression de ce récepteur varie d'une sous-unité de monocytes à l'autre. En effet, les monocytes non classiques expriment plus ce récepteur que les monocytes classiques qui pourraient avoir un rôle dans le passage des monocytes de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. De plus, la liaison de CX3CL1 à son récepteur augmente la survie des monocytes et le recrutement des lymphocytes pro-inflammatoires (Lee *et al.*, 2018). Quelques études ont démontré l'importance des récepteurs CCR2, CCR5 et CX3CR1 et de leurs ligands dans le processus athérogène. L'équipe du professeur Combadière, en utilisant un modèle murin *Apoe^{-/-}Ccl2^{-/-}Cx3cr1^{-/-}*, a démontré une augmentation du niveau de cholestérol, du taux de monocytes en circulation et de la corrélation avec une diminution de la formation des plaques athérosclérotiques par rapport au groupe contrôle. Dans le même groupe, ils ont démontré qu'une inhibition de CCR5 accentue le phénomène observé (Combadière *et al.*, 2008). Un autre groupe de recherche a démontré le rôle de ces marqueurs dans les sous-populations de monocytes accumulées à l'intérieur des plaques (Tacke *et al.*, 2007). Important membre de la famille des cytokines CXC, la chemokine CXCL4 participe activement au développement de l'inflammation. En plus de sa participation dans l'attraction des monocytes, cette chemokine est importante dans la formation des plaquettes dans les cas de lésions tissulaires ou de rupture des plaques. L'interaction de CXCL4 avec CCL5 a également été observée dans le processus de chemotaxie. En effet, la sécrétion de ces deux chemokines à la surface des cellules endothéliales entraîne la formation d'un complexe hétérodimérique qui permet d'augmenter l'adhésion des monocytes, ainsi que leurs extravasations (Domschke *et al.*, 2019). Une étude a également révélé que CXCL4 était impliquée dans l'apoptose des cellules endothéliales et dans les mécanismes de cytotoxicité (Woller *et al.*, 2008). CXCL4 est également retrouvée dans la survie et la prolifération des monocytes, mais aussi dans leur différenciation. Des études ont montré qu'une stimulation des macrophages avec CXCL4 entraînait un profil M1 et M2 combiné, qui laisse à penser que l'existence d'un

nouveau type d'activation des macrophages existerait. Certaines études n'hésitent pas à mentionner un profil M4 (Gleissner *et al.*, 2010). Cette nouvelle activation des macrophages semble produire en majorité des cytokines pro-inflammatoires, mais semble moins exprimer de récepteurs responsables menant à la formation des cellules spumeuses comme CD36. Une étude menée par le professeur Nassar a voulu mieux comprendre la fonctionnalité des macrophages M4 en présence de LDL. Ce faisant, ils ont pu démontrer que CXCL4 inhibe la liaison des LDL pour leurs récepteurs, ce qui favorise la formation des LDL oxydées. Ils ont également révélé que la chemokine augmentait la liaison des oxLDL aux cellules endothéliales et aux macrophages. Ces liaisons sont retrouvées dans la formation des cellules spumeuses formant les plaques athérosclérotiques (Nassar *et al.*, 2003).

1.6.2. Les cytokines

Parmi les médiateurs inflammatoires d'importance, les cytokines font partie d'un réseau complexe et essentiel de molécules capables de régir l'ensemble des fonctions du système immunitaire. Ce sont de petites molécules sécrétées par la totalité des cellules immunitaires qui permettent la communication et l'interaction entre elles. Contrairement aux chemokines, les cytokines ne servent pas à attirer les cellules vers le lieu d'infection, mais peuvent induire la sécrétion des chemokines. Ces molécules peuvent agir de manière autocrine, paracrine ou endocrine sur les cellules cibles et peuvent être divisées en deux groupes. Les cytokines pro-inflammatoires sont utiles pour l'initiation et le développement du processus inflammatoire tandis que les cytokines anti-inflammatoires ralentissent le processus inflammatoire et inhibent l'action des cytokines pro-inflammatoires.

1.6.2.1. Les cytokines pro-inflammatoires

Parmi les cytokines pro-inflammatoires indispensables dans l'amorce de l'inflammation, le $\text{TNF}\alpha$ et l' $\text{IFN}\gamma$ font partie des protéines essentielles. Ce sont les premières cytokines à être sécrétées lors d'une infection et elles permettent notamment de produire un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires et chemokines afin d'amorcer le processus

inflammatoire. Le $\text{TNF}\alpha$ est sécrété par de nombreuses cellules et est capable de se lier à un de ses deux récepteurs TNFR1 et TNFR2. La liaison du ligand pour un de ces récepteurs favorise la prolifération des cellules immunitaires et la synthèse des molécules inflammatoires, mais l'activation de TNFR1 permet également d'activer certains mécanismes d'apoptose. Comme mentionné précédemment, ces deux cytokines sont les principaux activateurs des macrophages M1 et des lymphocytes Th1. Malgré son activité pro-inflammatoire, le $\text{TNF}\alpha$ permet également d'entraîner la résolution de l'inflammation en inhibant l'extravasation des leucocytes et ainsi diminuer la gravité de l'inflammation (Michlewska *et al.*, 2009). Des souris aux prises avec une double délétion des gènes induisant l'expression du $\text{TNF}\alpha$ et de l'Apoe présentent une importante diminution du pourcentage de plaques athérosclérotiques et de l'expression d'ICAM-1, VCAM-1, et de MCP-1 (Ohta *et al.*, 2005). L' $\text{IFN}\gamma$, en plus d'initier le processus inflammatoire, permet de faire le lien entre le système immunitaire inné et le système adaptatif. Il participe à la présentation de l'antigène, à la production des protéines antibactériennes, à l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses et à l'activation des mécanismes antiviraux (Kak *et al.*, 2018). Produit par les cellules T et B, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK, l' $\text{IFN}\gamma$ est capable de dimériser les sous-unités IFNGR1 et IFNGR2 pour former le complexe hétérodimérique IFNR. La liaison du ligand pour son récepteur entraîne l'activation des voies de signalisation cellulaire impliquées dans de nombreuses fonctions ayant des effets protecteurs contre certaines maladies infectieuses et certaines formes de cancers (Kak *et al.*, 2018). Dans l'athérosclérose, l' $\text{IFN}\gamma$ participe à la formation des cellules spumeuses en augmentant l'expression de certains récepteurs impliqués dans l'incorporation des LDL par les macrophages (Wuttge *et al.*, 2004). Des modèles de souris *Apoe*^{-/-} n'exprimant pas l' $\text{IFN}\gamma$ ou son récepteur présentent une augmentation de la synthèse de collagène par les cellules musculaires lisses et une forte diminution de l'inflammation, ce qui corrèle avec une augmentation de la stabilité de la plaque (Gupta *et al.*, 1997). Premier groupe de cytokines qui a été répertorié, la famille des interleukines 1 regroupe 11 membres dont l'IL-1 α et l'IL-1 β . Elles participent activement à la lutte contre les microorganismes en activant la synthèse des cytokines inflammatoires et la production de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), en induisant l'expression des molécules d'adhésion et en participant à l'activation des macrophages (Libby *et al.*, 2017). La pro-

IL-1 β est clivée par la caspase-1 pour donner naissance à sa forme mature IL-1 β contrairement à sa forme alpha qui est synthétisée directement sous sa forme active. La caspase-1 est produite par un complexe protéique portant le nom d'inflammasome, qui participe à la maturation d'IL-1 β (Lopez-Castejon *et al.*, 2011). L'activation de l'inflammasome est fortement induite par les LDL oxydées, ce qui entraîne notamment l'accumulation de ces dernières dans les macrophages. Des études ont démontré que l'expression d'ICAM-1, VCAM-1 et MCP-1 était augmentée dans les cellules endothéliales sous l'effet de l'IL-1 β , participant ainsi au processus athérogène (Bevilacqua *et al.*, 1985). IL-1 β participant à la prolifération des cellules musculaires lisses et à la formation du cap fibreux (Libby *et al.*, 1988). L'impact d'IL-1 α sur le développement des maladies cardiovasculaires a également fait l'objet de certaines recherches. Il a été démontré que les macrophages traités avec des AG produisent plus d'IL-1 α et que ce phénomène entraîne une augmentation du processus athérogène (Freigang *et al.*, 2013). Ce même modèle a dévoilé l'importance d'IL-1 α dans l'ischémie du myocarde et du cerveau (Di Paolo *et al.*, 2016). Plus récemment, une étude a voulu comprendre l'impact d'une neutralisation totale d'une ou des deux formes d'IL-1 sur le développement de l'athérosclérose dans un modèle de souris *Apoe*^{-/-}. Le groupe de recherche a révélé que l'isoforme alpha était impliqué dans le développement initial de la plaque tandis que la forme bêta participe à la progression de l'athérosclérose en participant à la régulation de la réponse immunitaire adaptative (Vromman *et al.*, 2019). Certaines cytokines sont impliquées principalement dans la régulation du système immunitaire adaptatif comme c'est le cas de l'interleukine 9. Cette dernière est majoritairement produite par les lymphocytes T auxiliaires et par les cellules Mast. Malgré son rôle dans la croissance des cellules Th2, IL-9 est une cytokine pro-inflammatoire qui est retrouvée dans de nombreuses pathologies comme les allergies, les maladies infectieuses et certaines formes de cancers. Cette cytokine se lie à son récepteur IL-9R, exprimé à la membrane des cellules épithéliales et endothéliales notamment, qu'elle partage également avec les cytokines IL-2, IL-4 et IL-7. En 2013, une étude menée par l'équipe du professeur Gregersen a démontré que des patients souffrant de troubles vasculaires liés à l'athérosclérose présentaient un niveau élevé d'IL-9 en circulation (Gregersen *et al.*, 2013). Dans un modèle murin *Apoe*^{-/-}, un groupe de recherche a administré un anticorps anti-IL-9 afin de mieux comprendre le rôle

de la cytokine sur le développement de l'athérosclérose. Ils ont constaté que l'inhibition d'IL-9 entraîne une diminution du processus athérogène menant notamment à une diminution de l'expression de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales (Zhang *et al.*, 2015). Autre cytokine impliquée dans la régulation des cellules lymphoïdes, l'interleukine 17 rassemble trois formes de cytokines, soit l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-17C. L'IL-17 (IL-17a) est produite principalement par les lymphocytes Th17 qui participent à l'accumulation des cellules myéloïdes. Elle provoque l'activation des lymphocytes Th mais aussi des macrophages et des neutrophiles. Toutefois, le rôle de cette cytokine reste encore controversé. Des modèles *Apoe^{-/-} Il-17a^{-/-}* ont démontré le rôle athéroprotecteur de cette cytokine par la diminution de la production d'IFN γ dans ces modèles murins (Danzaki *et al.*, 2012). Cependant, d'autres études ont démontré l'importance d'IL-17 dans le recrutement des monocytes à l'intérieur de l'aorte et la diminution de facteurs pro-inflammatoires comme le facteur de stimulation des granulocytes (G-CSF) et IL-6 (Smith *et al.*, 2010). Cette dernière fait partie des cytokines possédant une activité pro et anti-inflammatoire. Il a été démontré qu'IL-6 promeut également le développement des plaques athéroscléroses dans certaines conditions. Une étude a utilisé un modèle de souris *Apoe^{-/-}* n'exprimant pas l'IL-6 afin de mieux comprendre l'impact de cette cytokine sur le développement de l'athérosclérose. Ce modèle a permis de constater une diminution du pourcentage de plaques chez les souris IL-6 déficient comparativement au modèle *Apoe^{-/-}*. Ils ont également constaté une augmentation de la cholestérolémie et une diminution de l'expression d'IL-10 dans les souris *Apoe^{-/-} Il-6^{-/-}*. De plus, les auteurs ont remarqué une diminution de l'infiltration des monocytes à l'intérieur de l'aorte dans ce groupe (Schieffer *et al.*, 2004). Les cytokines IL-12 sont des molécules pro-inflammatoires composées d'une forme hétérodimérique IL-12p70 et d'une forme homodimérique IL-12p40 qui sont produites principalement par les cellules myéloïdes et ont pour but de promouvoir l'immunité de type 1 en favorisant le recrutement des lymphocytes Th1. Ces cytokines favorisent le développement de l'inflammation en stimulant la production d'IFN γ notamment et en inhibant le développement des Th2. Une première étude en 1996 a mis en évidence le potentiel rôle croisé d'IL-12 et de la cytokine régulatrice IL-10 sur le développement de l'athérosclérose. Cette étude a démontré *in vitro*, que les monocytes traités avec des oxLDL produisent plus d'IL-12, mais que la sécrétion de la forme IL-12p70

était fortement augmentée avec l'utilisation d'un inhibiteur d'IL-10 par rapport aux cellules non traitées (Uyemura *et al.*, 1996). Plus tard, un groupe de recherche a démontré qu'un modèle de souris *Apoe^{-/-} Il-12^{-/-}* présentait une diminution d'environ 52 % de la formation des plaques athérosclérotiques en comparaison avec le groupe de souris *Apoe^{-/-}* (Davenport *et al.*, 2003).

1.6.2.2. Les cytokines anti-inflammatoires

Le processus inflammatoire, pour ne pas devenir un danger pour l'organisme, doit passer par une phase de résolution une fois l'infection éloignée. La diminution de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires au profit des cytokines anti-inflammatoires est une étape clé permettant l'initiation de cette phase. Dans ce contexte, les interleukines 4 et 13 font partie des cytokines anti-inflammatoires essentielles dans la régulation de l'immunité. Ces molécules sont sécrétées par la grande majorité de cellules du système immunitaire innées, mais principalement par les lymphocytes T et plus particulièrement par les lymphocytes Th2. Les cytokines IL-4 et IL-13 participent au développement de l'immunité de type 2, c'est-à-dire à la production d'anticorps, à l'activation des macrophages M2 et sont impliquées dans des mécanismes liés aux allergies et à l'asthme. La liaison d'IL-4 avec la sous-unité IL-4R entraîne sa dimérisation avec une seconde sous-unité comme IL-2Rc (récepteur IL-4 de type 1) ou IL-13R1 (récepteur IL-4 de type 2) pour former un complexe ligand/récepteur actif. La formation de ces deux types de récepteurs est hétérogène et dépend du type cellulaire où ils sont exprimés. Le récepteur IL-4 de type 1 est retrouvé à la surface des cellules myéloïdes et des lymphocytes tandis que les récepteurs IL-4 de type 2 sont exprimés dans les cellules myéloïdes, mais également à la surface des cellules non immunes (Junttila *et al.*, 2018). Ces derniers peuvent être également liés par la cytokine IL-13 qui peut aussi se lier à la sous-unité IL-13R2. Leurs rôles dans l'atténuation de l'inflammation suscitent l'intérêt de nombreuses recherches dans le but de trouver de nouvelles stratégies, notamment l'immunothérapie. Une étude menée en 2012 a mis en évidence le rôle athéroprotecteur d'IL-13. Ce groupe de recherche a pu observer une diminution des lésions vasculaires, de l'expression de VCAM-1 et de l'accumulation des plaques chez les souris *Ldlr^{-/-}* ayant reçu une injection intrapéritonéale en comparaison avec

celles ne l'ayant pas reçu. In vitro, ils ont pu constater que les macrophages ayant reçu un traitement IL-13 (M2) ont une meilleure capacité d'évacuer plus efficacement les oxLDL que les macrophages ayant reçu un traitement d'IFN γ (M1) (Cardilo-Reis *et al.*, 2012). Malgré le rôle anti-inflammatoire d'IL-4, ce dernier ne semble pas fournir une protection contre le développement de l'athérosclérose. Au contraire, dans une étude publiée en 2002, certains résultats remettant en cause le rôle anti-inflammatoire de cette cytokine dans un modèle de souris *Ldlr*^{-/-}. En effet, ce groupe de recherche a pu observer chez des souris femelles *Ldlr*^{-/-} *Il-4*^{-/-} que ces dernières présentaient un pourcentage de plaques moins important en comparaison avec des souris surexprimant la cytokine ou le groupe *Ldlr*^{-/-} (King *et al.*, 2002). Autre cytokine anti-inflammatoire d'importance, l'interleukine 10 fait partie des éléments clés dans le contrôle de l'inflammation. Sécrété par l'ensemble des cellules innées, IL-10 est impliquée dans le ralentissement du recrutement des leucocytes, dans la présentation de l'antigène et dans la synthèse d'une importante gamme de lymphocytes T. En d'autres termes, l'IL-10 permet la transition entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Concernant l'activation de ce dernier, IL-10 est impliqué dans l'activation des lymphocytes Th2 et dans l'inhibition du recrutement et de l'activation des Th1. Son action anti-inflammatoire provoque le recrutement des lymphocytes T régulateurs. La cytokine IL-5 fait partie des cytokines anti-inflammatoires étudiées dans le mécanisme menant à la formation des plaques athérosclérotiques. Même si aucune relation n'a encore été mise en évidence, une première étude a mis en évidence que la surexpression d'IL-5 dans les macrophages des souris *Ldlr*^{-/-} induit une diminution significative du pourcentage de plaque dans l'aorte par rapport aux souris *Ldlr*^{-/-}. Dans la même étude, il a été observé que les souris surexprimant la cytokine présentaient une diminution de la concentration des oxLDL et une augmentation de la production d'IgM (Zhao *et al.*, 2015). Une deuxième étude a confirmé ces résultats en démontrant que les souris *IL-5*^{-/-} *Apoe*^{-/-} présentaient moins de plaques que les souris du groupe *Apoe*^{-/-} (Knutsson *et al.*, 2019).

1.7. Voies de signalisation MAPK dans les monocytes/macrophages

Les voies de signalisation *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) sont activées dans l'ensemble des cellules de l'organisme et régulent des mécanismes cellulaires très divers comme la prolifération, la différenciation, la synthèse protéique ou l'apoptose. De nombreux stimulus extracellulaires comme les facteurs de croissance, les AG libres, les cytokines inflammatoires, les hormones et autres permettent leur activation.

Ce phénomène commence par la phosphorylation des résidus sérines et thréonines MAP kinase kinase kinase (MAP3K) à la suite de l'activation des récepteurs membranaires de types RTK ou RCPG par exemple. Ces dernières vont par la suite phosphoryler les MAP kinase kinase (MAP2K) qui vont à leur tour activer les MAPK composées de p38 (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ), des *extracellular signal regulated kinase* ou ERK (ERK1/2, ERK5) et des *c-Jun N-terminal kinase* ou JNK (JNK1, JNK2, JNK3) (Kyriakis *et al.*, 2012). Ces cascades de signalisation se terminent par la translocation des MAPK vers le noyau, permettant ainsi le recrutement de certains facteurs de transcription. La dérégulation des voies MAPK est à l'origine du développement de nombreuses maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose. Un résumé des voies de signalisation cellulaire MAPK a été schématisé dans la **figure 10** ci-dessous.

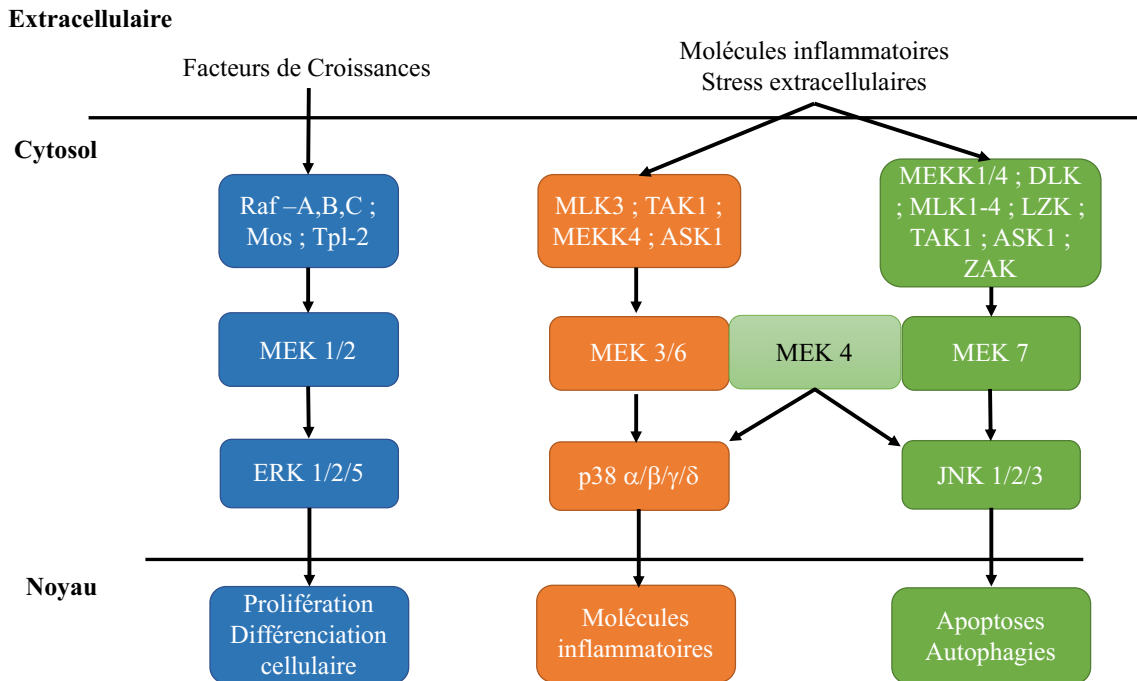


Figure 10 : Les voies de signalisations cellulaires MAPK

Les voies de signalisation intracellulaire MAPK peuvent être activées par les signaux extracellulaires comme les facteurs de croissance, les cytokines ou d'autres facteurs de stress. Dans un premier temps, cette cascade de signalisation débute par l'activation de plusieurs protéines MAPKKK comme les Raf, les MEKK, les MLK, les ASK, etc. L'activation de ces dernières entraîne la phosphorylation des protéines MEK et MKK pour permettre l'activation par la suite des trois principales kinases ERK, JNK et p38. Ces kinases auront un effet sur l'expression de plusieurs gènes régissant de nombreuses fonctions cellulaires par le recrutement de divers facteurs de transcription (Adapté de Roberts *et al.* 2007).

1.7.1. La voie ERK1/2

La voie ERK est composée de trois isoformes : ERK1, ERK2 et ERK5 de poids moléculaires de 44, 42 et 115 kDa respectivement. Elle répond principalement à des stimulus extracellulaires comme les hormones de croissance liant de nombreux récepteurs RTK. Une fois ce dernier activé, cela entraîne sa dimérisation et l'autophosphorylation des

résidus tyrosines. Cette étape occasionne le recrutement des protéines Grb2 et SOS qui ont pour effet de lier la protéine membranaire Ras. La liaison d'une molécule de GTP à Ras permet son activation et d'amorcer la cascade de signalisation menant à la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine retrouvés dans le motif TEY (thréonine/glutamine/tyrosine) de ERK et sa translocation au noyau (McKay *et al.*, 2007). Cette translocation génère le recrutement de plusieurs facteurs de transcriptions qui induisent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation et la prolifération cellulaire. Ces actions varient en fonction du type de stimulus extracellulaires et du type cellulaire où ERK est activé.

Dans les macrophages traités avec des oxLDL, un groupe de recherche a démontré que l'expression des récepteurs ABCG1 et CD36 (deux récepteurs participant à la formation des cellules spumeuses) était dépendante de l'activation de ERK chez le rat. Ils ont également démontré que ce mécanisme joue un rôle important dans la formation des cellules spumeuses (Xue *et al.*, 2016). En 2010, une étude a démontré que les macrophages traités avec l'IFN γ causent l'augmentation l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires comme MCP-1, ICAM-1, IP-10 et MIP-1 β . Cette étude a également rapporté que la phosphorylation en serine 727 de STAT1 par ERK induit une augmentation de l'expression de ces quatre molécules inflammatoires (N. Li *et al.*, 2010). Un traitement au LDL entraîne l'activation de la voie ERK, provoquant ainsi une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses chez le rat (Hu *et al.*, 2000). Toujours dans les CML, une étude a démontré que le palmitate favorise la résistance à l'insuline, en diminuant l'expression du co-activateur du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma (PPAR γ). Ce phénomène est notamment influencé par l'activation de ERK et du facteur nucléaire kappa B (NF κ B) (Coll *et al.*, 2006). Une étude a voulu mieux comprendre le rôle de ERK dans le développement de l'athérosclérose. Dans un premier temps, un marquage par immunofluorescence de ERK leur a permis d'observer préférentiellement la présence de la kinase à l'intérieur de la plaque plutôt qu'ailleurs dans l'intima des lapins soumis à une diète riche en gras. Ils se sont plus précisément rendu compte que ERK était plus fortement exprimé à l'intérieur des cellules musculaires lisses. À la suite de ces observations, ils ont démontré que la suractivation de ERK dans les CML

après un traitement au LDL *in vitro* permettait d'augmentait la migration et la prolifération de ces cellules (Hu *et al.*, 2000).

1.7.2. La voie p38

La protéine p38 est une kinase de 38 kDa composée de quatre différentes isoformes : p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ . Elle est activée par de nombreux stimulus associés au stress cellulaire et environnemental comme les chocs osmotiques et thermiques, les ultraviolets ainsi que de nombreuses cytokines/chemokines inflammatoires. La phosphorylation de p38 est assurée par l'activation de MKK3/6 et de MKK4, elle-même activée par le recrutement de MEK1/4, ASK 1/2, DLK. À noter que MEK4 permet également l'activation de la voie JNK. Comme les autres protéines de la voie MAPK, p38 est transloquée au noyau afin de réguler l'expression de certains gènes participant à la synthèse de molécules inflammatoires. Les mécanismes de translocation de p38 du cytoplasme restent complexes, car ce dernier ne possède pas de séquence de localisation nucléaire (SLN). La phosphorylation de p38 est le mécanisme de translocation vers le noyau le mieux connu, mais en ce mécanisme n'est cependant pas réversible. En effet, des études ont démontré que la liaison de p38 pour la MAPK-activated protéine kinase 2 (MK2), qui contient aussi bien une séquence SLN qu'une séquence d'exportation du noyau, favorise la sortie de p38 du noyau vers le cytoplasme (Gong *et al.*, 2010). La dérégulation de la voie p38 peut entraîner plusieurs pathologies cardiovasculaires et inflammatoires (Mayer *et al.*, 2006 ; Yokota *et al.*, 2016). Des études ont démontré que l'activation de p38 dans les cellules endothéliales participe à l'augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhésions comme la E-selectine, VCAM-1, et à l'augmentation de molécules chemoattractantes comme MCP-1 (Reustle *et al.*, 2018). Dans les mêmes conditions, il a été démontré que p38 participe à la régulation de l'expression d'IL-8 et à l'augmentation des ROS (Ryoo *et al.*, 2004). En 2012, un groupe de recherche a voulu étudier les effets d'un inhibiteur de p38, la *losmapimod*, chez des patients atteints d'athérosclérose. Cette étude n'a pas observé de différence significative en ce qui concerne la taille ou le pourcentage des plaques athérosclérotiques. Cependant, les patients ayant reçu l'inhibiteur de p38 ont présenté une diminution de certains marqueurs inflammatoires, ce qui suggère

que ce type de traitement pourrait être efficace à des stades plus précoces de la maladie afin de bloquer son développement (Elkhawad *et al.*, 2012).

1.7.3. La voie JNK

La voie JNK possède 3 différentes formes JNK1, JNK2 et JNK3 ayant un poids moléculaire compris entre 46 et 55 kDa. En réponse à certains facteurs de croissance et à de nombreuses cytokines, la protéine JNK est phosphorylée par l'activation de MKK 4/7 qui eux-mêmes sont activés par MEKK1-4, TPL-2, DLK, MLK1-3 et LZK (membres des MAP3K). Cette voie de signalisation est retrouvée dans l'ensemble des cellules humaines et son implication dans les mécanismes de morts cellulaires fait de JNK une molécule de grande importance dans la régulation cellulaire. La phosphorylation de JNK entraîne l'activation de nombreux facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation de facteurs pro et anti-apoptotiques (Cui *et al.*, 2007). Des études ont démontré que l'activation de JNK provoque la phosphorylation de la sérine 307 du substrat de récepteur à l'insuline -1 (IRS-1), ce qui a pour conséquence de participer à la résistance à l'insuline (Aguirre *et al.*, 2000). Dans un même contexte, il a été démontré que l'activation de JNK est impliquée dans la mort des cellules productrices d'insuline, entraînant la diminution de la production de cette hormone retrouvée chez les personnes atteintes de diabète (Cui *et al.*, 2007). En 2004, un groupe de recherche a publié dans le journal Science, leurs résultats liant l'activation de JNK1 et JNK2 sur la formation des cellules spumeuses menant à la formation des plaques athérosclérotique. Dans un premier temps, ils ont pu démontrer que la délétion de JNK2 dans un groupe murin *Apoe*^{-/-} entraîne une diminution plus importante de formation des plaques athérosclérotiques que dans les modèles *Apoe*^{-/-} *Jnk1*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}. Les auteurs ont révélé que les macrophages du groupe de souris *Apoe*^{-/-} *Jnk2*^{-/-} perdaient leurs capacités à former des cellules spumeuses et que ceci s'explique par une diminution de l'expression des récepteurs menant à leur formation de ces cellules (Ricci *et al.*, 2004).

1.8. Les protéines tyrosines phosphatases

Depuis plusieurs décennies maintenant, la structure et la fonctionnalité des protéines phosphatases sont soumises à de nombreuses recherches. Leur diversité et leur complexité forment un réseau de protéines impliquées dans la régulation de l'ensemble des voies de signalisations intracellulaires participant ainsi à l'ensemble des fonctions cellulaires. Parmi celles-ci, les protéines tyrosines phosphatases (PTP) suscitent l'intérêt de nombreux chercheurs et seront détaillées dans les prochaines sections. Purifiée pour la première fois en 1988, cette superfamille se distingue des autres familles de phosphatases par la conservation du motif HCX₅R, à l'intérieur de son site d'activation. Cette superfamille comprenant 107 phosphatases se divise en 4 familles réparties en fonction de la spécificité du substrat qu'elles ciblent. La famille des PTP de classe 1 rassemble les protéines déphosphorylant en tyrosine, en sérine et en tyrosine/thréonine leurs substrats. Cette famille se subdivise en deux principaux groupes regroupant les PTP classiques et les *dual specificity phosphatases* (DUSP). Ces enzymes ont pour but de catalyser la réaction d'hydrolyse qui permet d'enlever un ou plusieurs groupements phosphates du site catalytique des protéines tyrosines kinases et ainsi inhiber leur activité catalytique.

1.8.1. Les PTP classiques

Les PTP classiques se distinguent par leurs capacités de déphosphoryler spécifiquement les résidus tyrosines des protéines kinase. Transcrit à partir de 37 gènes, ce sous-groupe est composé des PTP classiques transmembranaires (RPTP) et des PTP classiques cytosoliques (CPTP). Les RPTP se composent d'un segment extracellulaire variable participant à l'adhésion cellules-cellules ou cellules-matrix extracellulaire. Leur section intracellulaire est composée de deux régions PTP en tandem appelées D1 et D2, impliquées dans l'activité catalytique. La régulation des RPTP peut être contrôlée par la liaison du ligand, ce qui entraîne la dimérisation du récepteur et inhibe l'activité phosphatase par superposition des domaines D1 des deux monomères. Cependant, la dimérisation des RPTP peut être renversée par la liaison d'un ligand sur chacune de ces sous-unités monomériques et ainsi réactiver la phosphatase. Les effets des espèces réactifs à l'oxygène

stabilisent la forme dimérique des RPTP par l'oxydation des groupements cystéines retrouvés dans le domaine D2 cytosolique (Tonks *et al.*, 2006). Les CPTP rassemblent 17 membres comme PTP1B, SHP1, SHP2 et STEP qui se distinguent par leurs différences structurelles autour du site catalytique. PTP1B est la première protéine tyrosine phosphatase à avoir été identifiée et son rôle sur le métabolisme et l'immunité a été fortement documenté depuis sa découverte (Wade *et al.*, 2018). Un modèle murin *Ptp1b*^{-/-} a permis de démontrer l'importance de cette phosphatase dans la régulation de la glycémie en augmentant la sensibilité à l'insuline, diminuant ainsi le niveau de glucose sanguin. Dans l'immunité, PTP1B influence la déphosphorylation de certaines voies de signalisations intracellulaires et permet la sécrétion de G-CSF et GM-CSF. Des études ont démontré que le groupe de souris *Ptp1b*^{-/-} présente une monocyturie élevée par rapport au groupe contrôle (Heinonen *et al.*, 2006). De nombreuses études ont démontré l'implication de SHP-1 dans la régulation de l'expression des récepteurs aux cytokines retrouvées à la surface des cellules myéloïdes. En effet, l'augmentation de l'expression de SHP-1 entraîne la diminution de l'expression des récepteurs d'IL-4, d'IL-13, d'IFN γ et du récepteur au GM-CSF, par l'inhibition de la voie JAK-STAT (Abram *et al.*, 2017).

1.8.2. Les DUSPs

Autres membres de la famille de PTP de classe 1, les *Dual Specificity Phosphatase* (DUSPs) représentent un important groupe de phosphatase. Parmi eux, une sous-famille portant le nom de MAPK phosphatase (DUSP ou MKP) comporte la particularité de déphosphoryler simultanément en sérine/thréonine et en tyrosine le domaine catalytique des MAPK. Ce sous-groupe comprend 10 membres composés d'un domaine catalytique en C-terminal, un domaine non-catalytique en N-terminal et un site actif PTPase. La séquence N-terminal, comprenant le domaine *kinase interacting motif* (KIM), permet la reconnaissance spécifique des différents substrats et la localisation cellulaire (Caunt *et al.*, 2013). Les différents membres des DUSPs se différencient les uns des autres par leur affinité pour les différentes protéines MAPK et leurs localisations dans la cellule. Ces spécificités permettent de les subdiviser en trois sous-catégories (**Figure 11**). Les DUSP1, DUSP2, DUSP4 et DUSP5 regroupent les phosphatases localisées dans le noyau cellulaire.

Les DUSP6, DUSP7 et DUSP9 sont localisées dans le cytosol et désactivent spécifiquement la voie ERK. Pour finir, les DUSP8, DUSP10 et DUSP16 regroupent les membres ciblant les voies JNK et p38 exclusivement (Caunt *et al.*, 2013). Les DUSPs atypiques représentent une autre forme de DUSPs. Ils ont la particularité de ne pas contenir de domaine de reconnaissance KIM. Cette sous-classe est connue pour cibler certaines formes de lipides et ARN, mais reste encore mal comprise.

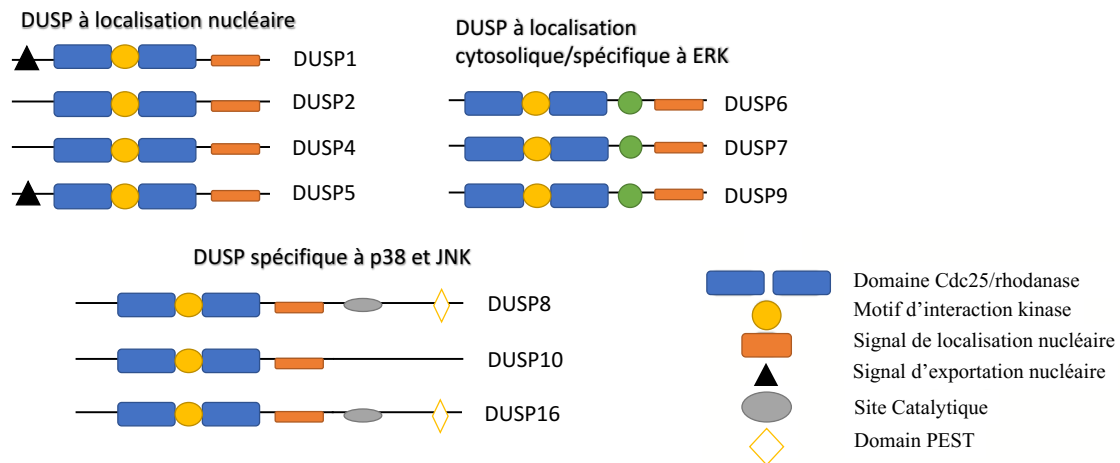


Figure 11 : Les différents sous-groupes de DUSPs et leurs structures

Les DUSP/MKP peuvent être divisées en trois sous-catégories de phosphatase réparties en fonction de l'affinité du substrat et/ou de leur localisation cellulaire. Les DUSP localisées dans le noyau sont composées de DUSP1, DUSP2, DUSP4 et DUSP6, tandis que les DUSP cytosoliques, connues pour déphosphoryler spécifiquement ERK, sont composées de DUSP6, DUSP7 et DUSP9. Les DUSP8, 10 et 16 sont connues pour inhiber les voies p38 et JNK (Adapté de Caunt *et al.*, 2013).

1.8.3. Spécificité et Régulation

Les DUSPs n'agissent pas de la même manière sur les voies p38, JNK et ERK. Le type cellulaire fait également partie des éléments à prendre en considération lors de l'étude des DUSPs. En effet, une étude a montré qu'une augmentation de l'expression de DUSP4 dans les podocytes (cellules épithéliales rénales) diminue l'activation de p38 et de JNK, mais

n'a pas d'effet sur l'activation de ERK (Denhez *et al.*, 2019). En revanche, il a été démontré que la délétion de DUSP4 à l'intérieur des macrophages augmente l'activation de ERK exclusivement (Neamatallah *et al.*, 2019). Comme les voies MAPK, l'expression des DUSPs aussi est soumise à différents systèmes de régulation. Dans un premier temps, les voies de signalisation MAPK, une fois activées, peuvent induire l'expression de certaines DUSPs qui pourront par la suite inhiber leur action. Dans un deuxième temps, les DUSPs peuvent subir certaines modifications post-traditionnelles (oxydation, myristoylation ou phosphorylation) favorisant ainsi leurs stabilités ou leurs dégradations. Une étude a démontré que la phosphorylation de DUSP1 par l'insuline augmentait sa stabilité dans les CML, ce qui induisait une réduction de l'activation de ERK et une diminution de la prolifération cellulaire (Jacob *et al.*, 2004).

Pour finir, la liaison du domaine catalytique des DUSPs par les MAPK entraîne une prolongation de l'activité phosphatase, mais une oxydation/réduction des résidus cystéines du même domaine génère une inactivation/activation de la phosphatase. Il existe également des « *crosstalk* » entre les DUSPs, c'est-à-dire que la délétion ou la surexpression d'une phosphatase peut influencer l'expression des autres DUSPs. C'est pour cette raison que lors de l'étude d'une de ces PTP, il est important de prendre en considération les niveaux d'expression des autres phosphatases. La **figure 12** ci-dessous présente un résumé des trois principaux mécanismes de régulation retrouvés chez les DUSPs.

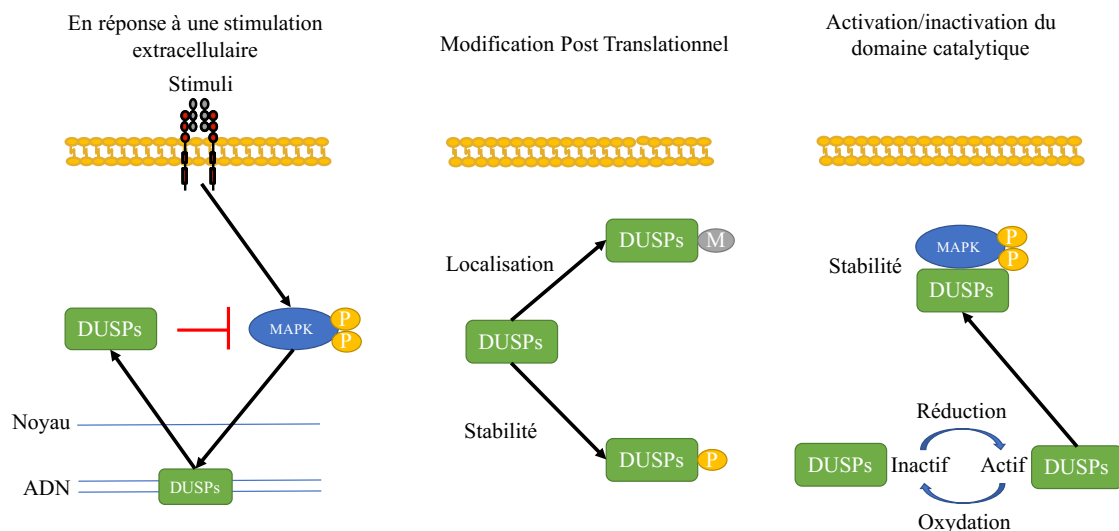


Figure 12 : Les différents mécanismes de régulation des DUSPs

Les DUSPs sont soumises à trois différents mécanismes de régulation. Le premier implique l'activation des voies MAPK qui provoque la transcription des gènes impliqués dans la synthèse des DUSPs. Des modifications post-translationnelles comme la phosphorylation qui entraîne la stabilité de la phosphatase participent également à la régulation des DUSPs. Le dernier mécanisme correspond à l'activation ou l'inactivation du domaine catalytique des phosphatases par des réactions d'oxydoréductions (Adapté de Patterson *et al.*, 2009).

1.8.4. DUSP1

La première phosphatase de la famille des DUSPs/MKP à avoir été découverte est DUSP1. Depuis, de nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre le rôle de DUSP1 sur plusieurs types cellulaires et dans certaines pathologies. Un modèle de souris *Dusp1*^{-/-} stimulé avec des lipopolysaccharides (LPS) a démontré une augmentation de l'activation de p38 et du récepteur *Toll like 4* (TLR4). Ce phénomène a pour conséquences d'augmenter la synthèse de nombreuses cytokines et chemokines proinflammatoires (Lang *et al.*, 2006 ; Patterson *et al.*, 2009). Ces résultats ont dévoilé l'importance de DUSP1 dans la synthèse de médiateurs inflammatoires, mais aussi dans la régulation de l'inflammation. Cette fois, un modèle de souris *Apoe*^{-/-} *Dusp1*^{-/-} a été créé par quelques groupes de recherches afin d'étudier son impact sur le développement de l'athérosclérose. Ils ont notamment découvert que les groupes n'exprimant pas DUSP1 développaient significativement moins de plaques que les groupes contrôles (Reddy *et al.*, 2004 ; Imaizumi *et al.*, 2010 ; Shen *et al.*, 2010). Ces groupes de recherches ont démontré également l'impact d'une délétion de DUSP1 sur l'expression de certaines cytokines/chemokines en circulation. Ils ont constaté notamment la diminution de MCP-1, d'IL-1 α et TNF α , des acteurs importants dans le développement des plaques. Ils ont également observé une forte diminution de l'infiltration des monocytes à l'intérieur de l'aorte. *Ex vivo*, ces études ont cherché à comprendre l'impact d'une délétion de DUSP1 sur l'activation des voies MAPK dans les macrophages et sur leurs capacités à migrer. Ils ont remarqué une augmentation de la phosphorylation de ERK dans le groupe de souris n'exprimant pas la phosphatase et également une diminution de la prolifération des macrophages.

1.8.5. DUSP4

Autre membre de la famille des DUSPs à localisation nucléaire, la phosphatase DUSP4 joue un rôle important dans la régulation de l'immunité. Une étude a démontré que les macrophages n'exprimant pas DUSP4 augmentaient l'activation de la voie JNK et p38 en réponse à un traitement au LPS. Ces macrophages produisent également plus de cytokines pro-inflammatoires que les macrophages exprimant DUSP4. Cette même étude a aussi démontré qu'une infection des macrophages *Dusp4^{-/-}* au parasite *Leishmania mexicana* induit une augmentation de la réponse inflammatoire de type 1 et une diminution des macrophages à se débarrasser du parasite. Cette étude est l'une des premières à avoir démontré le rôle de DUSP4 dans la lutte contre les microorganismes étrangers (Al-Mutairi *et al.*, 2010). Toujours au sein des macrophages, une étude plus récente a publié des résultats concernant les effets de la délétion de DUSP4 sur l'expression génique. Ce groupe de recherche a découvert que les macrophages *Dusp4^{-/-}* présentent une importante diminution de certains facteurs de différenciations et de proliférations cellulaires comme M-CSF et le facteur de différenciation associé aux macrophages (MMD). Ils ont également démontré que ce type de cellule prolifère moins en l'absence de DUSP4 (Neamatallah *et al.*, 2019). Notre laboratoire a récemment mis en évidence l'impact de DUSP4 dans la néphropathie diabétique qui représente une importante conséquence de défaillance rénale chez les personnes diabétiques. Dans un premier temps, nous avons constaté que les conditions d'hyperglycémie induisent une diminution de l'expression de DUSP4 dans les podocytes et les glomérules. Cette diminution entraîne l'augmentation de l'activation des voies p38, JNK et l'augmentation de l'expression de NOX4, ce qui induit un dysfonctionnement des podocytes (Denhez *et al.*, 2019). C'est à partir de ces résultats que nous est venu l'intérêt d'étudier le rôle de DUSP4 dans le développement de l'athérosclérose.

1.8.6. DUSP6

Dans les décennies suivant la découverte de DUSP1, d'autres phosphatases de la même famille ont été découvertes, celles-ci ayant des fonctions essentielles dans la régulation du

système immunitaire et dans le développement de complications vasculaires. Par exemple, une étude de Hsu et collaborateurs a révélé l'importance de DUSP6 dans la régulation de l'expression d'ICAM-1 dans les cellules endothéliales (Hsu *et al.*, 2018). Ils ont démontré qu'une délétion de DUSP6 dans un modèle murin, soumis à un environnement pro-inflammatoire, induit une forte diminution de l'expression d'ICAM-1 dans les cellules endothéliales de l'aorte et de la veine cave inférieure. Ces travaux pourraient laisser croire que DUSP6 joue un rôle important dans l'adhésion monocytes/cellules endothéliales et favoriserait le processus athérogène.

1.9. Les effets de la lipotoxicité sur les macrophages

La lipotoxicité se définit comme étant un effet néfaste de l'accumulation de lipides à l'intérieur des cellules non-adipocytaires, comme les macrophages, les myocytes ou les hépatocytes (Wende *et al.*, 2012). Ces conditions entraînent une dérégulation de plusieurs voies de signalisation menant à de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Le palmitate est l'acide gras saturé à longue chaîne le plus abondant retrouvé en circulation chez les personnes obèses. Il représente environ 30 % des AG dans l'ensemble de l'organisme et est retrouvé dans l'alimentation ou synthétisé de manière endogène (Carta *et al.*, 2017). Dans l'alimentation, le palmitate est présent dans certaines margarines, huiles, pâtes à tartiner, mais également dans le lait maternel. La synthèse de novo du palmitate permet de réguler sa concentration en cas de manque ou d'excès par l'apport alimentaire. L'entrée du palmitate dans la cellule peut se faire de plusieurs manières. Comme mentionné dans les sections précédentes, le palmitate peut entrer dans la cellule sous l'effet de la lipoprotéine lipase contenue à la surface des cellules ou grâce à l'albumine. Parmi ces effets lipotoxiques, l'apoptose cellulaire, l'induction de la synthèse de molécules inflammatoires, l'augmentation de la production des ROS et de NO font partie des effets principaux (Korbecki *et al.*, 2019 ; Tzeng *et al.*, 2019).

Une fois dans le cytosol, le palmitate est métabolisé en DAG et céramides. La production de DAG permet entre autres l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui entraîne la production des espèces réactive à l'oxygène (ROS) et active NFκB. La surproduction des ROS entraîne d'importants dysfonctionnements menant à de nombreuses complications

métaboliques et vasculaires (Ly *et al.*, 2017). Les espèces réactives à l'oxygène, comme le radical libre hydroxyl, le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, sont des molécules chimiques contenant de l'oxygène hautement réactif. Leurs productions sont principalement issues des mitochondries et au niveau cytosol par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NOX), la xanthine oxydase ou la monoxyde d'azote oxydase incomplète (Nowak *et al.*, 2017). Une étude a démontré que la surexpression de NOX4 (sous-unité de NOX) dans les cellules endothéliales des souris *Apoe*^{-/-} induit une diminution de l'athérosclérose après 24 semaines. Ils ont également observé une augmentation des lymphocytes Treg responsables de la régression de la pathologie (Craigie *et al.*, 2015). Le facteur de transcription NFκB participe à la synthèse des molécules inflammatoires comme IL-1α, IL-6 ou le TNFα, à la régulation de l'inflammation, à la prolifération et à l'apoptose des cellules (Ajuwon *et al.*, 2005 ; Tzeng *et al.*, 2019). Les sous-unités de NFκB sont associées à la sous-unité inhibitrice IκB qui, lors de l'activation du complexe IκB kinase, se dissocie du reste du complexe NFκB, ce qui permet son activation et sa translocation au noyau. Afin de mieux comprendre l'importance de l'activation de ce facteur dans le développement de l'athérosclérose, des études ont montré une importante activation de NFκB dans les macrophages, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales en condition d'hypercholestérolémie. Depuis, différents groupes de recherches ont démontré l'implication de NFκB dans la modification des LDL, le recrutement des monocytes, l'adhésion cellulaire et le dysfonctionnement endothélial (Janabi *et al.*, 2000 ; Robbesyn *et al.*, 2004 ; de Winther *et al.*, 2005).

Certaines études ont mis en évidence que le palmitate pouvait activer les récepteurs de type TLR dans les cellules immunes (Korbecki *et al.*, 2019). Ces récepteurs agissent sur de nombreuses voies de signalisation pouvant moduler l'expression de nombreux gènes régulant d'importantes fonctions des macrophages. Ces études ont démontré que la liaison du palmitate au récepteur TLR4 induit l'expression du facteur de transcription MyD88 qui participe à l'augmentation de l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires comme MCP-1, TNFα, CCL4, ou encore IL-1α (Korbecki *et al.*, 2019).

Comme mentionné précédemment, le palmitate peut être métabolisé en céramides. Ces lipides sont des composés hautement toxiques et participent à l'apoptose des macrophages. Le groupe de recherche du professeur Vincent Duronio s'intéresse particulièrement aux

mécanismes d'apoptoses des macrophages à la suite d'un traitement aux céramides. Ils ont montré que les LDL oxydés étaient capables d'inhiber les effets des céramides sur l'apoptose des macrophages par l'activation de la protéine kinase B qui permet de maintenir le niveau protéique de Bcl-X1, un facteur anti-apoptotique (Hundal *et al.*, 2003). Cette découverte peut laisser à penser que les LDL oxydés favorisent la survie des macrophages et ainsi augmentent la formation des cellules spumeuses. Il a également été montré que le palmitate active la phosphorylation de JNK dans les macrophages et que ce dernier inhibe des facteurs de transcriptions responsables de la synthèse de certaines cytokines anti-inflammatoires comme IL-10. Cette même étude a démontré que le palmitate induit une activation des macrophages de type M1 (Riera-Borrull *et al.*, 2017).

Hypothèse/Problématique

L'athérosclérose est une des principales complications macrovasculaires liées à l'obésité. Cette pathologie se manifeste par une accumulation de corps gras à l'intérieur de l'aorte menant à la réduction de la lumière artérielle et l'augmentation du risque de thrombose. Une dyslipidémie sévère peut provoquer la suractivation des voies MAPK à l'intérieur des cellules et favoriser ainsi la progression de la pathologie. Les phosphatases de la famille des DUSPs ralentissent l'activité des voies MAPK mais certaines études ont démontré que la délétion de DUSP1 dans des modèles de souris proathérogènes, provoquait une importante diminution du pourcentage de plaque athérosclérotique à l'intérieur de l'aorte. Ces observations corrèlent également avec une diminution de la complexité de la plaque et une diminution de certains facteurs pro-inflammatoires en circulation chez les souris *Apoe*^{-/-}*Dusp1*^{-/-} par rapport aux souris *Apoe*^{-/-}. Notre laboratoire étudie depuis de nombreuses années les effets de DUSP4 sur certaines complications cardiovasculaires et maladies rénales. Plus récemment une étude a montré que les macrophages murins *Dusp1*^{-/-} proliféraient moins que les macrophages exprimant la phosphatase. Une diminution de la prolifération des macrophages est associée à une diminution de la formation des plaques athérosclérotiques. À ce jour aucune explication *in vitro* n'a été trouvée afin de mieux comprendre les observations *in vivo* dans les souris *Apoe*^{-/-}*Dusp1*^{-/-}. Dans le cadre de ce projet, nous voulions étudier l'impact de la délétion de DUSP4 sur le développement de l'athérosclérose dans des modèles murins *Apoe*^{-/-} soumis à une diète riche en gras. Nous avons également cherché à mieux comprendre l'effet du palmitate et de DUSP4 sur le profil inflammatoire des macrophages péritonéaux des souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-}.

Objectifs

Pour mieux comprendre l'impact de DUSP4 dans le développement du processus athérogène, nos objectifs de recherche dans le cadre de ce projet sont :

- *In vivo*, de déterminer l'impact d'une délétion systémique de DUSP4 sur le pourcentage de plaque accumulée dans l'aorte des souris *Apoe*^{-/-}.
- *In vivo*, de déterminer l'impact d'une délétion systémique de DUSP4 sur le profil inflammatoire des cytokines en circulation et du taux de monocytes en circulation.
- *Ex vivo*, de déterminer les effets du palmitate sur l'activation des voies MAPK et sur l'expression de DUSP4 dans les macrophages péritonéaux murins.
- *Ex vivo*, de déterminer le rôle de la délétion de DUSP4 sur l'activation des voies MAPK et sur l'expression des cytokines/chemokines clés par les macrophages.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Modèle animal

Plusieurs modèles animaux génétiquement modifiés sont utilisés afin de mimer les conditions de dyslipidémie favorisant ainsi la formation des plaques athérosclérotiques. L'organisation de l'expérience *in vivo* est représentée dans la **Figure 13**. Lors de ce projet, le modèle de souris *Apoe*^{-/-} a été utilisé. Ce dernier présente une délétion de l'apolipoprotéine E qui permet le recyclage des VLDL et des chylomicrons par le foie ce qui entraîne une hausse du cholestérol sanguin (Veseli *et al.*, 2017). Ce modèle induit la formation spontanée des plaques, mais une diète riche en gras est généralement utilisée afin d'accélérer leur formation. Afin de mieux comprendre le rôle de DUSP4 dans l'athérosclérose deux groupes de souris ont été utilisés, soit le groupe *Apoe*^{-/-} et le groupe *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} dans le cadre de ce projet fourni par l'entreprise *The Jackson Laboratory* et le laboratoire *Molkentin* respectivement. Ces deux groupes ont été soumis à une diète riche en gras (40% de lipides) qui a été fournie par l'entreprise *Envigo*, après 8 semaines d'âge et durant 4 semaines. Les souris qui ont été utilisées pour la partie *ex vivo* du projet n'ont pas été soumises à la diète grasse. Après 12 semaines d'âge, les souris ont été euthanasiées après avoir été anesthésiées à l'isofurane (5%). Par la suite, l'animal a été ouvert par l'abdomen et le sang a été récolté à l'aide d'une seringue imbibée d'héparine (agent anticoagulant) à l'apex du cœur. Le sang a été centrifugé durant 5 min à 1500 rotations par minute (rpm) dans un tube collecteur pour récolter le plasma qui a été conservé à -80 °C. L'aorte a été récupérée de son origine à la sortie du ventricule gauche du cœur jusqu'à sa séparation aux artères iliaques. Elle a été conservée à -80 °C pour les analyses protéiques et ARNm. Les aortes de souris utilisées pour la coloration en phase *Oil red O* ont été préalablement nettoyées avec 10 mL d'une solution saline tamponnée phosphate (PBS) au niveau de l'apex de cœur afin de nettoyer l'aorte puis 10 mL de formaline, fourni par l'entreprise *VWR* (numéro de catalogue 89370-094) ont été injectés. Une fois fixée, l'aorte a été récoltée et immergée dans la formaline durant 24h puis plongée dans l'éthanol 70 % pour être conservée à 4 °C. L'artère bronchocéphalitique a également été isolée lors de

l'euthanasie des souris et conservée à 4 °C dans la formaline pour l'analyse de la complexité de la plaque.

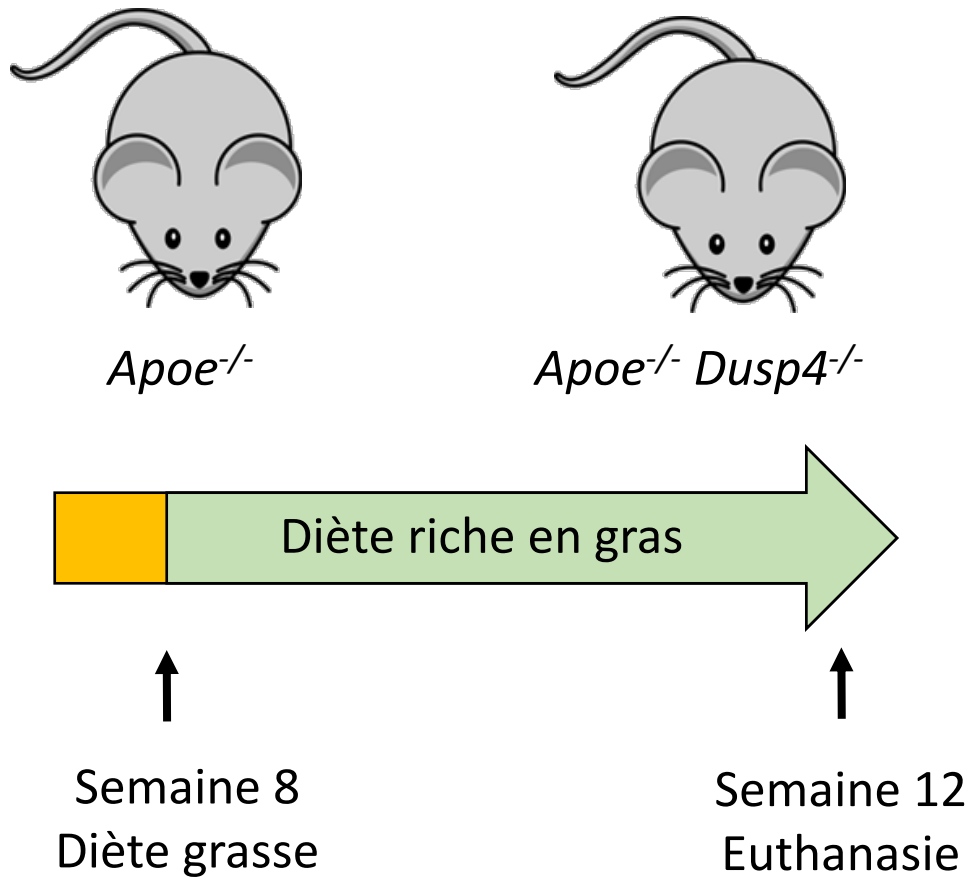


Figure 13 : Organisation de l'expérience *in vivo*

Les groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} ont été soumis à une diète riche en gras après 8 semaines d'âge. L'euthanasie des souris a été réalisée à 12 semaines d'âge.

2.2. La préparation du palmitate

Le palmitate a été préparé à partir d'une solution de palmitate de sodium (*Sigma* numéro de catalogue P9767) qui a été ajouté dans une solution de 0,1 mol/L d'hydroxyde de sodium. Pour dissoudre le palmitate de sodium, ce dernier a été dissous entre 55 °C et 70 °C sous agitation. En parallèle, une solution de 3,34 mmol/L d'une solution d'albumine

bovin sérique ou BSA (*Sigma* numéro de catalogue 10775835001) dissous dans l'eau nano qui a été maintenu à une température de 50 °C. Une fois les deux solutions parfaitement dissoutes, elles ont été mélangées (ratio volumique 1:6) afin d'obtenir une solution palmitate/BSA. Une fois refroidie, cette solution a été filtrée avec un filtre 0,22 µm (*Millipore-Sigma*, numéro de catalogue SLGP033RS) puis dosé grâce au kit *NEFA-HR2* de *Fujifilm Wako Diagnostic USA* (numéro de catalogue 999-34691, 995-34791, 991-34891, 993-35191). La solution palmitate/BSA a été conservée à -20 °C durant un mois et la solution a été chauffée à 37 °C durant 30 minutes avant utilisation.

2.3. Les macrophages murins péritonéaux

Les macrophages murins qui ont été récoltés à partir des modèles de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} nous ont permis de mieux comprendre l'impact de la délétion de DUSP4 sur l'expression ARNm de certains marqueurs inflammatoires, mais également sur l'activation des voies ERK, p38 et JNK. Le traitement au palmitate a également été utilisé sur ces cellules afin de mieux comprendre les effets lipotoxiques de ce dernier. Ce paramètre étant un élément clé de cette partie du projet, les souris n'ont pas été soumises à la diète riche en gras afin d'étudier seulement l'impact du palmitate.

Pour commencer, les souris âgées de 12 semaines des groupes *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} ont été injectés à l'intérieur de la cavité intrapéritonéale avec une solution de 2 mL de thioglycolate *Brewer* 3 % diluée dans l'eau stérile. Après 4 jours, les cellules ont pu être collectées. Pour ce faire, les souris ont été anesthésiées avec l'isofurane et la peau de la cavité abdominale a été retirée sans endommager la cavité intrapéritonéale. Ensuite, un volume de 5 mL de PBS stérile a été injecté dans la cavité puis la solution de PBS a été aspiré après un léger massage de l'abdomen. Cette étape a été répétée à trois reprises pour une récolte comprise entre 10 et 12 mL de volume contenant en moyenne 15 à 30 millions de cellules par souris compté à l'aide d'un hémacytomètre. Suite à la récolte, les tubes ont été centrifugés à 1500 rpm durant 5 min et le surnageant a été aspiré. Le culot de cellules a été resuspendu avec 10 mL de milieu de culture *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI), 10 % de sérum fœtal bovin (FBS), 1 % d'une solution de Pénicilline/streptomycine (P/S) chauffé à 37° C dans un bain-marie. Dans une plaque de 6

puits et afin d'atteindre entre 90 et 100% de confluences entre 1,5 et 2 millions de cellules ont été mises en culture dans chaque puits. Après 2 à 3 h d'incubation à 37 °C et 5 % de CO₂, le milieu a été aspiré et les cellules ont été lavées avec le milieu de culture RPMI 10% FBS, 1 % P/S afin de retirer les cellules non-adhérentes. Par la suite, 1,5 mL de ce milieu a été ajouté dans chaque puit puis les plaques ont été incubées à 37 °C et 5 % de CO₂ durant 24 h. Le lendemain le milieu a été aspiré et 1,5 mL de milieu RPMI 0 % FBS et 1 % P/S a été ajouté avec ou sans 75 µmol/L de palmitate durant 24 h. Les plaques de 6 puits ont été organisées de manière à obtenir un puits par condition soit : un puits représentant les conditions *Apoe*^{-/-} (contrôle), un puits *Apoe*^{-/-} avec le traitement au palmitate, un puits *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} et un puits *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} avec le palmitate. Une plaque a été réalisée pour l'extraction protéique et une plaque pour l'extraction d'ARNm.

2.4. Analyses protéiques par immunobuvardage

Afin d'évaluer l'impact du traitement au palmitate et de la délétion de DUSP4 *ex vivo* sur l'activation des MAPK et sur l'expression de DUSP4, la technique d'immunobuvardage a été utilisée. Suite au traitement au palmitate, le milieu de culture a été aspiré. Les cellules adhérentes ont été mises sur glace et lavées avec du PBS froid. Une fois le PBS aspiré, un volume de 150 µL de tampon de lyse a été introduit dans chaque puits afin de lyser les membranes cellulaires. Après 20 min à 4 °C, les puits ont été grattés afin de récolter la majorité du tampon de lyse contenant les composants cellulaires pour être transférée à l'intérieur d'un tube avant d'être centrifugée durant 10 min, à 13 000 rpm et à 4 °C. Le surnageant des différents échantillons a été récolté par la suite. Le **Tableau 3** ci-dessous présente la composition du tampon de lyse utilisé pour l'extraction protéique.

Tableau 3 : La composition du tampon de lyse

Concentration des solutions	
Eau distillée	Volumes variables selon le volume final
Tris-HCL, pH :7,4	50 mmol/L
NaCl	150 mmol/L
EDTA ; pH :7,4	2 mmol/L
Triton	0,1%
NaF	1 mmol/L
Na ₃ VO ₄	1 mmol/L
PMSF	1 mmol/L
Aprotinine	0,0255 mg/mL
Leupeptine	0,01 mg/mL

Afin d'obtenir la même quantité de protéines pour l'analyse par immunobuvardage (entre 20 µg et 50 µg), les échantillons ont été dosés avec les réactifs *DC Protein Assay* de l'entreprise *BioRad* (numéro de catalogue : 500-0113,0114,0115). Pour ce faire, une courbe standard de BSA de concentration connue (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, et 14 µg) a été utilisée. Une fois les volumes nécessaires calculés, 5 µL de Laemmli 4x ont été introduit dans chaque échantillon et ces derniers ont été chauffés durant 5 min entre 70 °C et 90 °C. La composition de la solution de Laemmli 4X est présentée dans le **Tableau 4**. Ils sont par la suite centrifugés quelques secondes à 13000 rpm.

Tableau 4 : La composition du Laemmli 4X

	Laemmli 4 X	Concentration finale
1 M Tris-HCl, pH :6,8	5 mL	62,5 mmol/L
Glycérol	8 mL	10 %
SDS 10%	1,6 g	2 %
β-mercaptoéthanol	1,6 mL	300 mmol/L
Bleu de bromophénol 0,05%	80 mg	0,1 %
Eau distillée	5 mL	

Un marqueur de poids moléculaire *Precision Plus Protein Dual Color standard* de BioRad est utilisé afin d'identifier les protéines comprises entre 17 et 250 kDa. Les poids moléculaires de protéines étudiés sont compris entre 38 et 45 kDa, donc un gel de 10 % d'acrylamide a été nécessaire pour séparer les protéines lors de la migration. Pour ce faire, un tampon de migration (25 mol/L de Tris-base, 1 % SDS, 1,92 mol/L de glycine dans de l'eau Nano) a été nécessaire afin d'immerger complètement les gels d'acrylamides. La composition de ces gels a été résumé dans le **Tableau 5** ci-dessous.

Tableau 5 : La composition pour deux gels d'acrylamide

	Gel Concentrateur	Gel séparateur 10 %
Eau distillée	5,8 mL	9,7 mL
Acrylamide 40 %	1 mL	5 mL
Tris-HCl 1,5 mmol/L, pH :8,8		1 mL
Tris-HCl 1 mol/L , pH :6,8	1 mL	
SDS 10 %	80 μ L	200 μ L
APS 10 %	80 μ L	100 μ L
TEMED	8 μ L	10 μ L

Les échantillons ont été migrés pendant 10 min à 110 V à travers le gel concentrateur puis entre 40 min et 1 h à 200 V à travers le gel séparateur. Pendant ce temps, une membrane de polyvinylidene difluoride ou PVDF (*Millipore* numéro de catalogue IPVH00010) a été lavée avec de l'eau distillée puis activée avec du méthanol durant 30 secondes et à nouveau lavée dans de l'eau distillée pour finir par être immergée dans une solution de tampon de transfert (25 mmol/L Tris-base, 1,92 mol/L de glycine, 20 % de méthanol dilué dans de l'eau NANO). Une fois la migration terminée, les gels d'acrylamides ont été déposés sur la membrane de PVDF activée et ont été introduits dans un montage permettant l'humidification constante de la membrane et également le transfert des protéines et du marqueur de poids moléculaire sur la membrane de PVDF. Pour ce faire, le transfert a été réalisé sur une durée de 45 min à 100 V à 4 °C. Une fois le transfert terminé, les membranes ont été plongées dans une solution de Ponceau S 0,1 % afin de vérifier la présence de bulles d'air et de protéines sur la membrane suite. Lors de cette étape, les membranes ont été coupées afin de garder seulement les poids moléculaires d'intérêts (région entre 50 kDa et 37 kDa dans notre cas). Les membranes ont été bloquées pendant 1 h dans une solution de lait 5 %-PBS-Tween 0.1 % sous agitation à température ambiante. Suite au blocage, les membranes ont été placées dans des tubes d'anticorps primaire dilués à 1 : 1000 dans une solution de lait 5 %-PBS-Tween 0,1 % ou dans une solution de BSA 5 % diluée dans une solution de PBS-Tween 0,1 %. La liste des anticorps utilisés lors de ce projet est présentée dans le **Tableau 6**. L'incubation a duré toute une nuit sous agitation à 4 °C. Par la suite, les membranes ont été lavées à trois reprises durant 10 min dans la solution de PBS-Tween 0.1 %. À la fin des lavages, elles ont été incubées dans une solution d'anticorps secondaire anti-*rabbit* ou anti-*mouse* diluée dans une solution lait 5 %-PBS-Tween 0,1 % pendant 1 h sous agitation à température ambiante. Suite aux trois lavages de 10 min sous agitation avec la solution de PBS-Tween 0,1 %, les membranes ont été révélées avec une solution de ECL de l'entreprise *Thermofisher Scientific* (PI32106) ou une solution de *Luminata Forte* (WBLUF0100) avant d'être introduites dans l'appareil *ChemiDoc MP Imaging System* de *Bio Rad*. Le logiciel Image Lab, relié à l'appareil *Chemidoc*, a permis de capturer l'image représentant les différentes bandes protéiques retrouvées sur la membrane. L'intensité des bandes est proportionnelle au niveau d'expression de la protéine. Une fois le rapport protéine d'intérêt/actine calculé, les conditions variantes (comme le traitement

au palmitate) ont été comparées à la condition sans traitement. Ce calcul a permis de mesurer l'impact des différentes conditions variantes sur l'expression protéique.

**Tableau 6 : La liste des anticorps utilisés pour l'expérience
d'immunobuvardage**

Anticorps primaire	Dilution (v:v)	Fournisseur	Numéro de catalogue	Anticorps secondaire
p38 (mouse)	1/1000 Lait 5 %	Cell signaling	9212S	1/10000 (anti-mouse)
p-p38 (mouse)	1/1000 BSA 5 %	Cell signaling	9216S	1/5000 (anti-mouse)
p-ERK (rabbit)	1/1000 Lait 5 %	Cell signaling	9101S	1/10000 (anti-rabbit)
ERK (rabbit)	1/1000 Lait 5 %	Cell signaling	9102S	1/10000 (anti-rabbit)
p-JNK (mouse)	1/1000 Lait 5 %	Santa Cruz	sc7345	1/10000 (anti-mouse)
JNK (mouse)	1/1000 Lait 5 %	Santa Cruz	sc6254	1/10000 (anti-mouse)
DUSP4 (rabbit)	1/1000 Lait 5 %	Abcam	ab216576	1/2500 (anti-rabbit)
DUSP4 (rabbit)	1/1000 Lait 5 %	Santa Cruz	sc1200	1/2500 (anti-rabbit)
Actine	1/7500	Santa Cruz	sc1616	

2.5. Analyse de l'expression ARNm – PCR quantitative

2.5.1. Extraction ARNm/ Dosage Nanodrop

Lors de la fin du traitement au palmitate, le milieu de culture des macrophages péritonéaux a été aspiré. Rapidement 1 mL de *Tri-Reagent* (*Moléculaire Research Center*; TR188-500) a été ajouté dans chaque puits à température ambiante sous la hotte chimique durant 5 min. À partir de cette étape, les cellules peuvent être conservées à -80 °C. Par la suite, 200 µL de chloroforme ont été ajoutés et agités vigoureusement durant 20 secondes. Suite à une incubation de 15 min à température ambiante, les échantillons ont été centrifugés durant 15 min, à 12000 g et à 4 °C. La phase aqueuse contenant les ARNm ont été récoltés et précipités avec 500 µL d'isopropanol durant 10 min, puis centrifugés à 4 °C, à 12000 g durant 8 min. Le surnageant a été retiré par inversion afin de conserver le culot d'ARNm qui a été mélangé avec 1 mL d'éthanol 75 % *RNase free* pour être conservé à -20 °C et centrifuger durant 5 min à 4 °C à 7500 rpm. Une fois le surnageant jeté et le culot séché, ce dernier a été resuspendu avec 10 µL d'eau *RNase Free* (#129112; *Qiagen*). Enfin l'ARN peut être conservé à -80 °C.

2.5.2. Transcriptase inverse en ADNc

Comme pour les protéines, afin d'avoir une quantité égale d'ARNm par échantillon, ces derniers ont été dosés par l'appareil *NanoDrop 2000* de *ThermoFisher Scientific*. Cette technique a permis de calculer le volume nécessaire pour obtenir 1 g d'ARN pour l'étape de transcriptase inverse. Suite au dosage, 1 µL d'un mélange de nucléotides et 1 µL de *Random Primer* (*Invitrogen*) ont été ajoutés à l'ARN. Afin d'avoir un volume égal pour chaque échantillon, ils ont été complétés à 12 µL avec de l'eau *RNase free*. Pour la dénaturation de l'ARN, les tubes ont été chauffés à 65 °C durant 5 min à l'aide de l'appareil C1000 *Thermal Cycler* de *BioRad*. Une fois la dénaturation terminée, un mélange de 2 µL de DTT 0,1 mol/L, 1 µL de *RNase out*, 4 µL de *5X First Strand Buffer* et 1 µL de *MMLV* (*Invitrogen*) a été ajouté au mélange précédent. Les tubes ont été introduits de nouveau dans l'appareil C1000 *Thermal Cycler* de *BioRad* durant 50 min à 37 °C puis 15 min à 70

°C pour l'étape de transcription inverse. Une fois l'ADN complémentaire obtenu, 80 µL d'eau *RNAse free* ont été ajoutés et puis les échantillons ont été conservés à -80 °C.

2.5.3. qPCR

Afin de quantifier l'ADNc de chaque échantillon, la technique de *Syber Green* par PCR quantitative a été utilisée. Le *Syber Green* est un agent intercalant fluorescent qui se lie à l'ADN double brin et la fluorescence qu'il émet peut-être ainsi mesurer. Les résultats obtenus ont été transposés en quantité d'ARNm exprimée. Dans une plaque de 96 puits, 24 échantillons différents ont été disposés afin de mesurer l'expression de deux gènes. La liste amorces utilisées dans le cadre de ce projet est présentée dans le **Tableau 7**. Pour ce faire, 620 µL de *Syber green*, 6,2 µL de chaque amorce et 484 µL d'eau stérile sur glace ont été utilisés pour la préparation des échantillons avant l'analyse (**Tableau 8**). Les mélanges ont été réalisés en duplicate sur une même plaque. Une fois la plaque préparée, cette dernière a été centrifugée à 1000 rpm durant 30 secondes et à 4 °C. La plaque a été par la suite introduite dans un appareil *qPCR Realplex Mastercycler* de l'entreprise *Eppendorf* et le programme suivant a été respecté: 40 cycles de 15 secondes à 94 °C (séparation des brins d'ADN), 15 secondes à 60 °C (hybridation) et 20 secondes à 72 °C (élongation). La **Figure 14** représente un résumé du programme utilisé pour la technique de qPCR.

Tableau 7 : La liste des amorces murines qPCR utilisées

Gènes murins	Forward	Reverse
DUSP1	GAGGAAAGCGCGGTGAAG	GGTGTCTGTGGCCCTAAGTC
DUSP4	ACGGCCCTCCTGAATGTCT	CACTTGTAAGTGGTAATGACCCTCAA
DUSP6	TCCTAGGGACTGTGAGCAAACC	GGATCCAACCCGGTGTGTTTC
CD36	TGGGCTTGGTACCCAGCTT	GGGCATAGTATCAACTGACAGGAA
CX3CR1	GCTTTTGCTACTTCCGCATCA	CTGGCCTTCTTGCGATTCTT
CXCR4	TCCAACAAGGAACCCTGCTT	TGGTGGGCAGGAAGATCCTA
CCL2	CTTCCTCCACCACCATGCA	CCAGCCGGCAACTGTGA
CCR2	TTCAGAAAGCACATTGCTAAACG	CGATCTGCTGTCTCCCTATAGAAAA

CCL5	GTCGTGTTTGTCACTCGAAGGA	GATGTATTCTTGAACCCACTTCTTCTC
IL-1α	GAAGAGACCATCCAACCCAGAT	TGCCTGACGAGCTTCATCAG
IL-1β	TGGTGTGTGACGTTCCCATT	CAGCACGAGGCTTTTTTGTG
TNFα	TCAAATGGGCTTTCCGAATT	CCTTTGCAGAACTCAGGAATGG
M-CSF	TGAAGGTCCTGCAGCAGTTG	GGTCTACAAATTCAAAGGCAATCTG

Tableau 8 : La composition pour un échantillon et pour 24 échantillons de qPCR

	Pour un échantillon	Pour 24 échantillons	Concentration final
2X Master Mix Syber Green	10 μ L	620 μ L	1x
Gene F primer 100uM	0,1 μ L	6,2 μ L	500 nmol/L
Gene R primer 100uM	0,1 μ L	6,2 μ L	500 nmol/L
Eau stérile	7,80 μ L	19,50 μ L	
ADNc échantillon (10ng/uL)	2 μ L	5 μ L	1 ng/ μ L

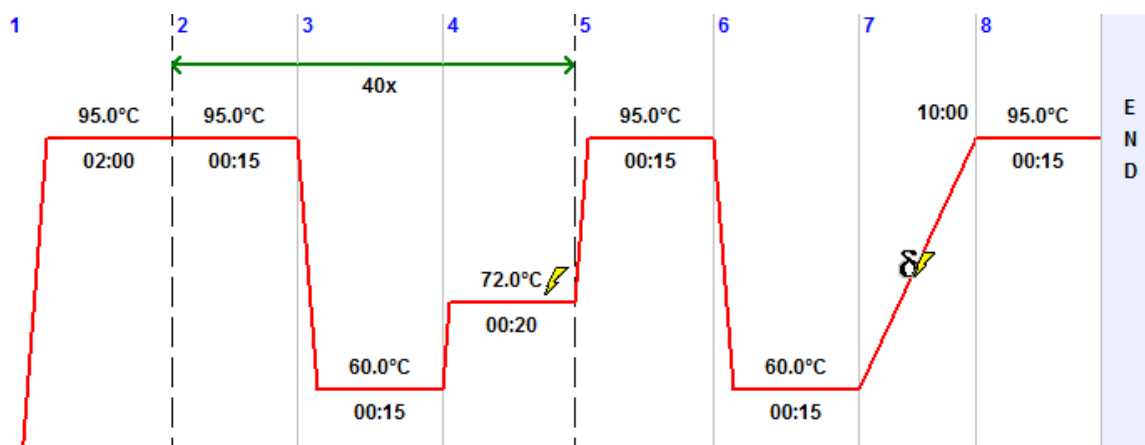


Figure 14 : Le programme de qPCR

Le programme de qPCR qui a été utilisé présente un cycle de 15 secondes à 95 °C puis à 60 °C durant 15 secondes et enfin à 72 °C durant 20 secondes qui représente respectivement les étapes de séparation des deux brins d'ADN, d'hybridation et d'élongation (2-4). Ce cycle a été répété 40 fois. À la fin du dernier cycle les échantillons sont restés à 95 °C durant 10 min.

2.6. Analyse *Luminex*

Afin de déterminer le profil inflammatoire des cytokines/chemokines, la technique de *Luminex* a été utilisée sur le plasma des deux groupes de souris. Cette technique se base sur l'émission de photons induits par deux types de fluorochromes différents couplés à des anticorps liés aux antigènes spécifiques contenus dans l'échantillon. Un anticorps a permis de déterminer la concentration de l'antigène et un autre anticorps a permis de déterminer le type d'antigène lié (dans notre cas la cytokine/chemokine). Pour ce faire, le kit *MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead (EMD Millipore)* a été utilisé sur des échantillons de plasma issus des groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} soumis à une diète riche en gras (expérience *in vivo*). Le **Tableau 9** représente l'ensemble des molécules analysées lors de l'expérience *Luminex*.

Tableau 9 : La liste des billes utilisées dans l'expérience du *Luminex*

Cytokines/Chemokines (Anti-Mouse)	Numéro de catalogue
Eotaxine	METXN-MAG
G-CSF	MGCSF-MAG
GM-CSF	MGMCSF-MAG
IFN γ	MIFNG-MAG
IL-1 α	MIL1A-MAG
IL-1 β	MIL1B-MAG
IL-2	MIL2-MAG

IL-3	MIL3-MAG
IL-4	MIL4-MAG
IL-5	MIL5-MAG
IL-6	MCYIL6-MAG
IL-7	MIL7-MAG
IL-9	MIL9-MAG
IL-10	MIL10-MAG
IL-12p40	MIL12P40-MAG
IL-12p70	MIL12P70-MAG
IL-13	MIL13-MAG
IL-15	MIL15-MAG
IL-17	MIL17-MAG
IP10	MIP10-MAG
KC	MKC-MAG
LIF	MLIF-MAG
LIX	MLIX-MAG
MCP-1	MCYMCP1-MAG
M-CSF	MMCSF-MAG
MIG	MMIG-MAG
MIP-1α	MMIP1A-MAG
MIP-1β	MMIP1B-MAG
MIP-2	MMIP2-MAG
RANTES (CCL5)	MMRNTS-MAG
TNFα	MCYTNFA-MAG
VEGF	MVEGF-MAG

2.7. Analyse par cytométrie de flux

La journée précédant l'euthanasie des souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-}, quelques gouttes de sang ont été récoltées à la base de leurs queues à l'aide d'un microcapillaire. Les échantillons ont été transférés dans des tubes héparinés contenant 600 µL d'une solution de tampon de lyse et conservés sur glace à l'abri de la lumière. Par la suite les échantillons ont été centrifugés durant 5 min à 5000 rpm à température pièce. Pendant ce temps le cocktail d'anticorps a été préparé suivant les dilutions indiquées dans le **Tableau 10**. Suite à l'étape de centrifugation, le surnageant a été aspiré et le culot a été resuspendu dans 50 µL dans la solution d'anticorps préparée préalablement. Suite à une agitation de 30 min à 4 °C, les échantillons ont été lavés avec 400 µL d'une solution de PBS stérile. Les échantillons ont été centrifugés durant 5 min à 5000 rpm à température pièce avant l'acquisition des résultats par l'appareil *Cytoflex 30* fourni par l'entreprise *Beckman*. L'interprétation des résultats présentée dans la **Figure 18** a été possible grâce au logiciel *CytExpert 1.2*.

Tableau 10 : La préparation d'anticorps utilisée pour l'expérience de cytométrie de flux

Anticorps	Fournisseurs	Dilution dans le PBS stérile	Numéro de catalogue
CD11b-FITC	<i>BD</i>	1/100	Cat #553310
F4/80-PCP	<i>eBioscience</i>	1/400	Cat #45-4801-82
Gr-1-APC	<i>eBioscience</i>	1/400	Car #51-5931-83
CD44-PE	<i>eBioscience</i>	1/300	Cat# 12-0441-81

2.8. Immunohistologie

Suite à l'euthanasie des souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} qui ont été soumises à une diète riche en gras, 10 mL de PBS a été injecté dans l'apex du cœur, suite au lavage, 10 mL de formaline a été injecté au même endroit afin de fixer l'aorte et la BCA. Une fois isolée, l'artère a été coupée à l'aide d'un binoculaire et plongée dans un tube de formaline durant

2 à 4h à 4 °C. Le lendemain la formaline a été remplacée par de l'éthanol 70 % afin d'être conservé à 4 °C. Les BCA, une fois dégraissées, ont été mises dans des cassettes et envoyées à la plateforme d'histologie de l'Université de Sherbrooke où ils ont été mis dans des blocs de paraffines. Ces derniers ont été utilisés pour faire trois coupes de 4 µm sur lame. La plateforme a également réalisé la coloration au Trichrome de Masson sur une des trois coupes. Les deux autres coupes paraffinées ont été utilisées pour la coloration α-SMA et Mac-2 par immunohistochimie. Pour ce faire les lames ont été déparaffinées par immersion dans des bains successifs de xylène durant deux reprises de 5 min, dans l'éthanol pur a deux reprises de 3 min, dans l'éthanol 95 % durant 3 min, dans l'éthanol 70 % durant 3 min, dans l'eau distillée à deux reprises de 2 min et dans le PBS pour finir. Par la suite les lames ont été immergées dans une solution de citrate de sodium 10 mmol/L à pH 6 durant 7 min. Après deux lavages de 5 min au PBS 1X, les lames ont été bloquées 1 h avec une solution de sérum d'âne (NGS) 10 % à température ambiante. Suite au blocage, les lames ont été incubé soit avec l'anticorps primaire α-SMA anti-*rabbit* (*Abcam*) dilué 1/100 avec le NGS 1 %, soit avec l'anticorps primaire Mac-2 anti-*rabbit* dilué 1/50, toute une nuit à 4 °C. Le lendemain les lames ont été lavées à trois reprises avec du PBS 1X durant 5 min avant d'être immergées dans une solution d'anticorps secondaires anti-*rabbit* diluée 1/500 pendant 1 h. Les lames ont été lavées à trois reprises avec du PBS 1X durant 5 min, puis séchées à T.P., avant d'être observées.

2.9. Coloration par *Oil Red O* des aortes de souris

L'athérosclérose se traduisant par une accumulation de corps gras à l'intérieur de l'aorte et que ce phénomène est dû notamment à la captation de ces corps gras par les macrophages, il a été important de pouvoir observer ces phénomènes durant ce projet. La technique de coloration en face par *Oil red O* a été utilisé pour mettre en évidence ces accumulations de corps gras dans l'aorte des différents groupes de souris. À l'aide d'un microscope binoculaire, l'aorte a été dégraissée et découpée de manière longitudinale. Par la suite, les aortes ont été immergées dans des eppendorf contenant de l'*Oil red O* 0.7 % dilué dans du propylène glycol durant 24 h à 37 °C. Le lendemain, les aortes ont été lavées avec de l'eau distillée durant 1 min et trempées dans du méthanol durant 1 min. Par la suite, elles ont été

lavées avec l'eau distillée durant 1 min puis immergées dans une solution de *Fast green* 0,05 % durant 1 min. Après avoir été imbibées dans une solution de PBS 1X, les aortes ont été déposées sur des lames avec deux gouttes de *Fluromont* afin de fixer une lamelle par-dessus l'aorte. L'observation des lames a été réalisée 24 h plus tard.

2.10. Analyses statistiques

L'ensemble des résultats qui ont été obtenus dans ce projet sont présentés par leur moyenne plus ou moins l'écart type de cette moyenne. Les graphiques et les tests statistiques présentés ont été réalisés grâce au logiciel *Graphpad prism 8*. Les tests statistiques qui ont été réalisés sont le one-way ANOVA pour les graphiques comprenant plus de deux populations et le t-test pour les graphiques ayant juste deux groupes à comparer entre eux. Les valeurs « hors limites » ou « aberrantes » ont été exclues des graphiques grâce au test ROUT (« Identify outlier »). Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque que la valeur de p obtenue était inférieure à 0,05.

3. Résultats

3.1. Projet *in vivo*

3.1.1. Les effets de DUSP4 sur la formation des plaques athérosclérotiques

Pour cette étude les groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} ont été soumis à une diète riche en gras durant 4 semaines. Par la suite les souris ont été euthanasiées et l'aorte a été récoltée afin de mettre en évidence en rouge le pourcentage de gras accumulé par la coloration en face à l'*Oil red O*. Les **Figures 15 A et 15 B** présentent un exemple d'aorte des groupes *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} respectivement. Le calcul du pourcentage de plaque s'est fait en divisant la surface rouge par rapport à la surface verte, provoqué par le *Fast Green*. La **Figure 15 C** regroupe les résultats du pourcentage de plaque obtenus sur l'ensemble des souris (N=10-11) des groupes *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} utilisés dans le cadre de ce projet. Les souris du groupe *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} présentent un pourcentage de plaque compris entre 2 % et 6 % comparativement à des pourcentages variant de 6 % à 18 % pour le groupe *Apoe*^{-/-}. Les moyennes et les écarts types du pourcentage de plaque des groupes *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} sont de 8.61 ± 1.39 et 4.23 ± 0.62 respectivement, soit une diminution significative de plus de 50 % entre les deux groupes. Nous avons également observé que la région de la crosse aortique présentait une accumulation de plaque plus importante que dans le reste de l'aorte des deux groupes de souris.

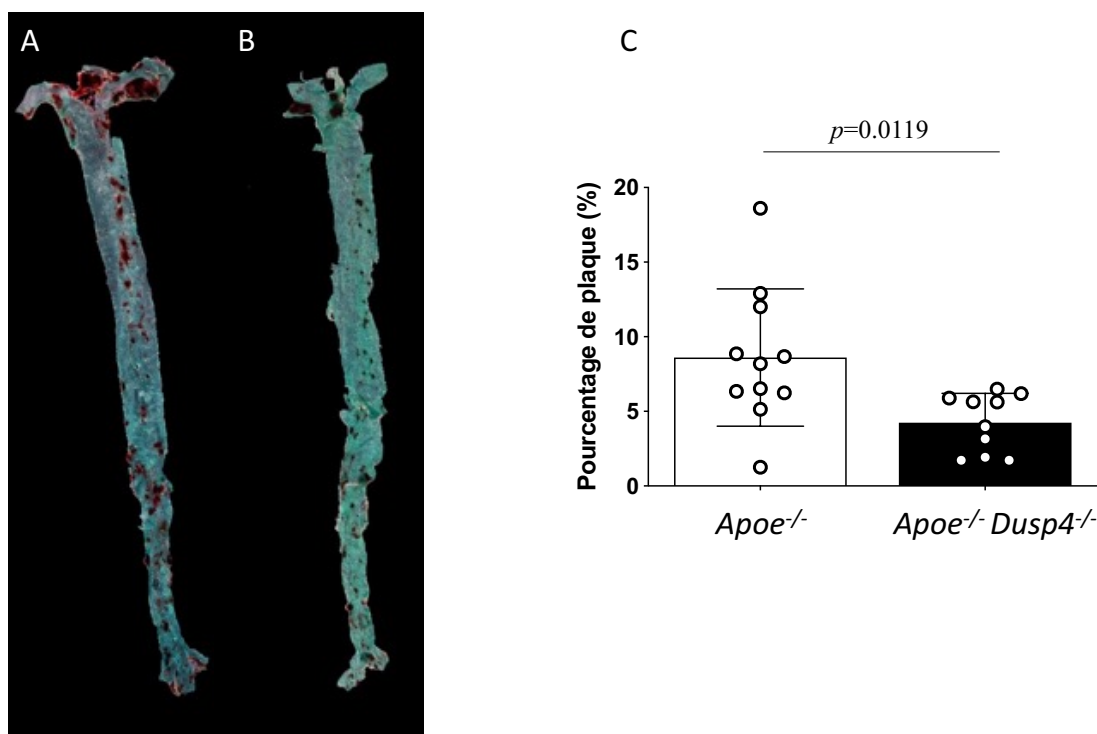


Figure 15 : Les effets de DUSP4 sur la formation des plaques athérosclérotiques

Accumulation des plaques athérosclérotiques dans l'aorte des souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-}. Coloration Oil red O des aortes de souris *Apoe*^{-/-} (A) et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} (B) et analyse du pourcentage de plaque des deux groupes de souris (C) (N=10-11).

3.1.2. Les effets de DUSP4 sur la structure de la plaque

La complexité de la plaque a été observée à partir de la BCA des groupes *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} ayant reçu une diète riche en gras. La technique d'immunohistologie a été utilisée avec le trichrome de Masson afin de mettre en évidence le diamètre artériel et les plaques athérosclérotiques. En effet, cette triple coloration permet de marquer en violet le cytoplasme cellulaire, en bleu les fibres de collagènes et en noir le noyau cellulaire. Les **Figures 16 A et 16 B** représentent un exemple de BCA issu des groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} colorée avec le trichrome de Masson.

Le marquage avec α -SMA (rouge)/Mac-2 (vert) ont permis de mettre en valeur l'infiltration des macrophages à l'intérieur de la plaque. Le marqueur α -SMA identifie spécifiquement l'actine exprimée à l'intérieur de CML en rouge tandis que le marquage Mac-2 est associé à la galactine-3 exprimée à la surface des macrophages. Le modèle de souris *Apoe*^{-/-} est caractérisé par une accumulation de macrophages et de CML à l'intérieur des plaques. Les **Figures 16 C** et **16 D** représentent un exemple de BCA issu des groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} marquée au α -SMA/Mac-2.

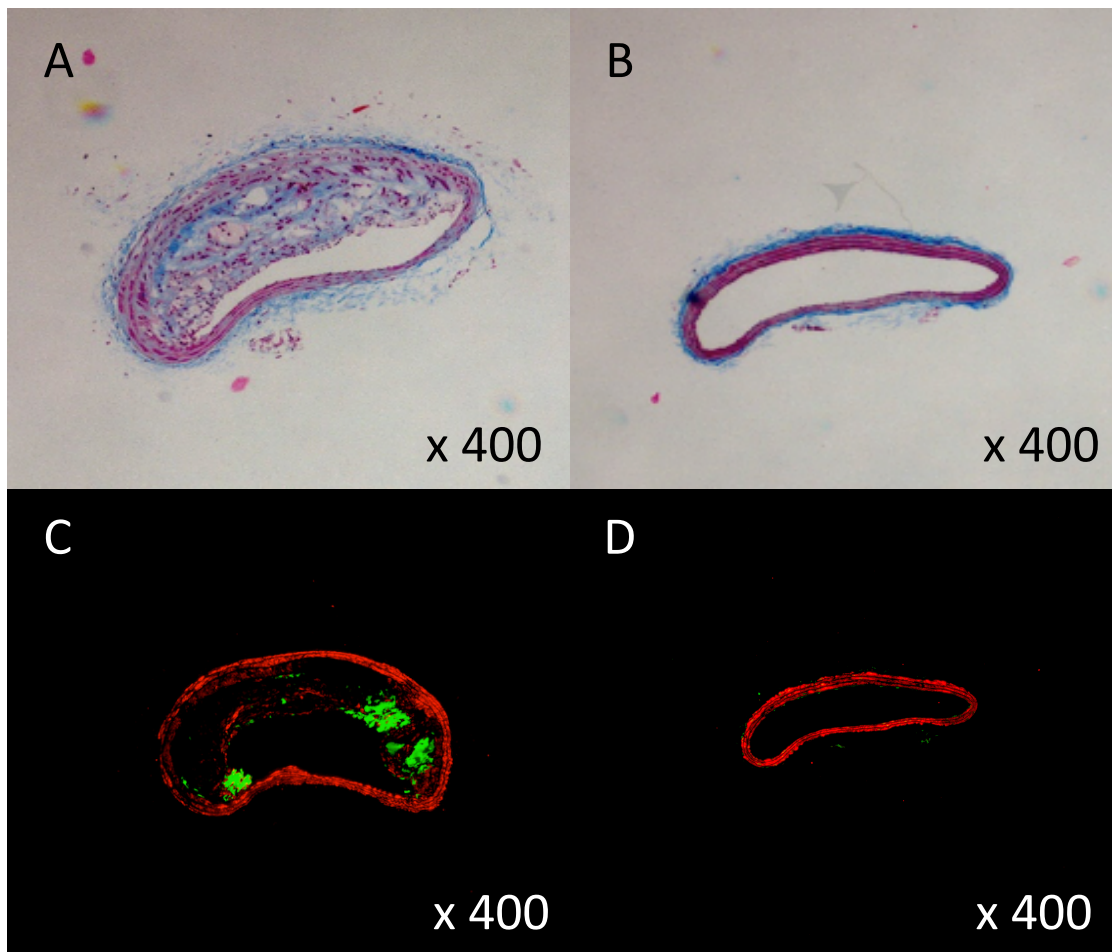


Figure 16 : Les effets de DUSP4 sur la complexité de la plaque

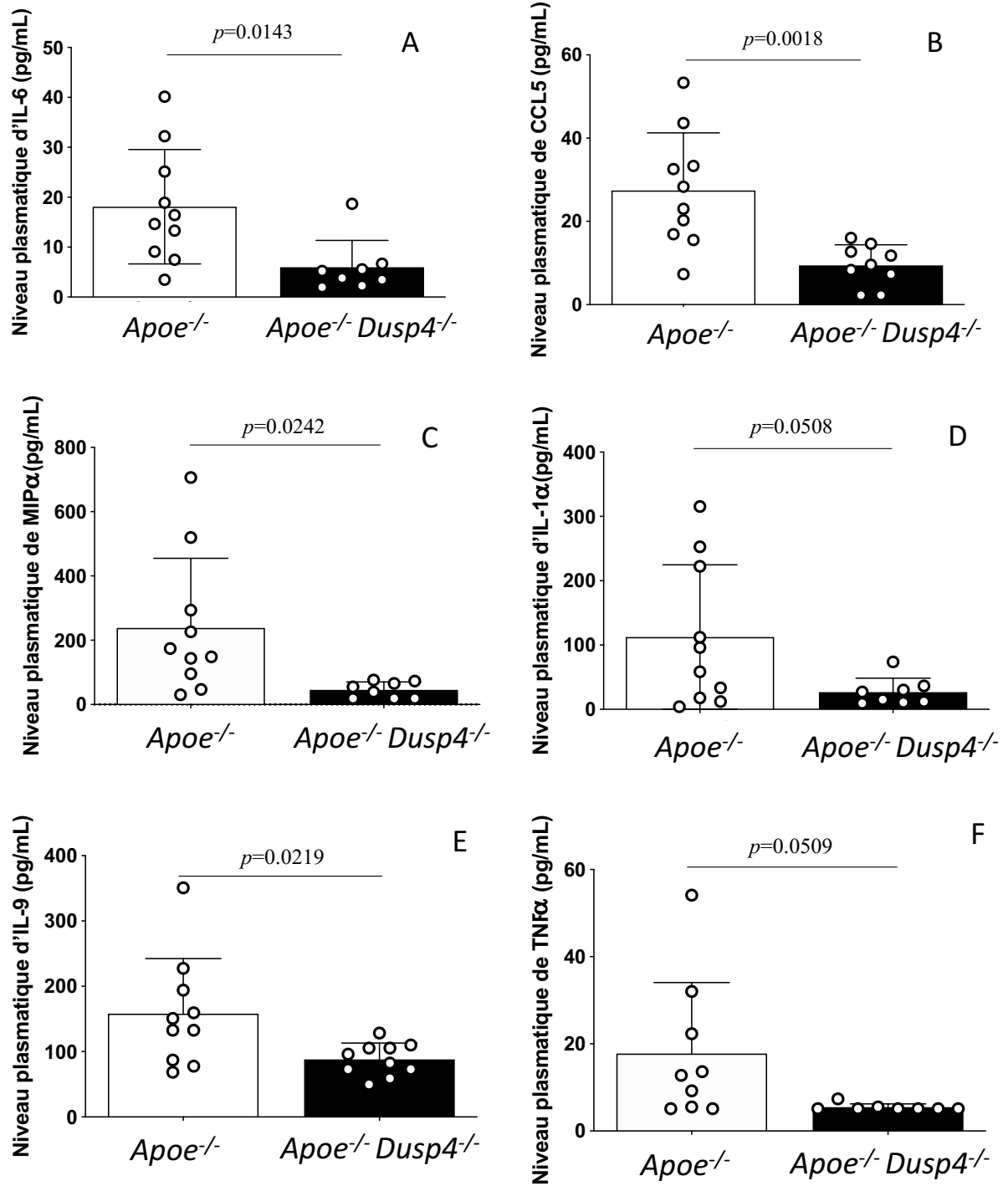
Coupe transversale des BCA issues des groupes de souris *Apoe*^{-/-} (A et C) et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} (B et D) suite à une coloration immunohistochimique au trichrome de Masson (A et B) et au α -SMA/Mac-2 (C et D).

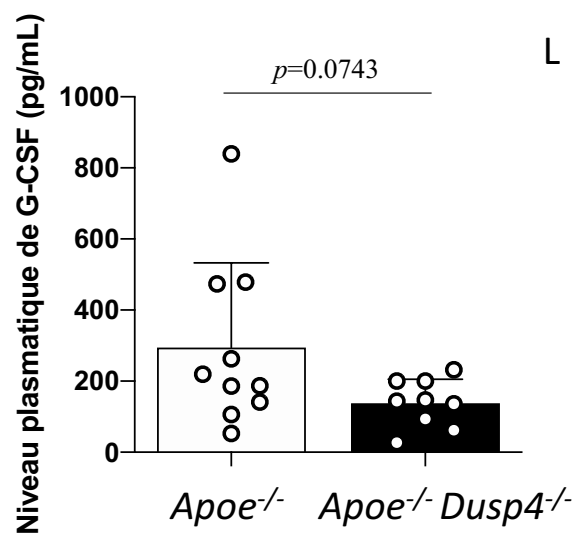
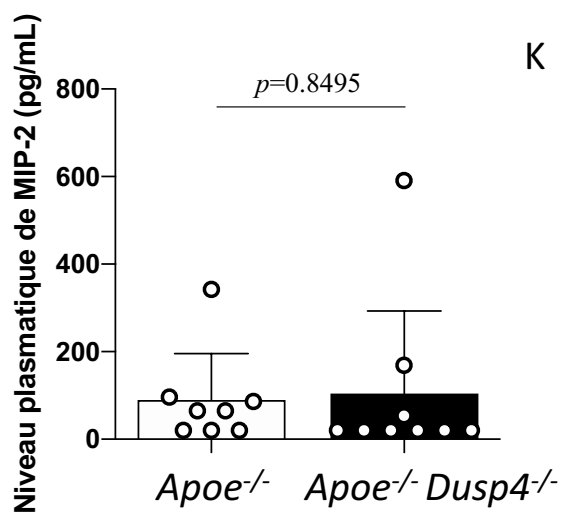
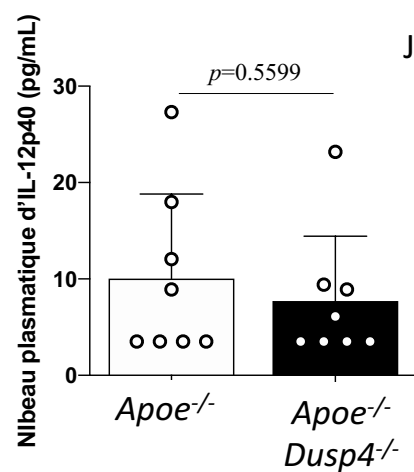
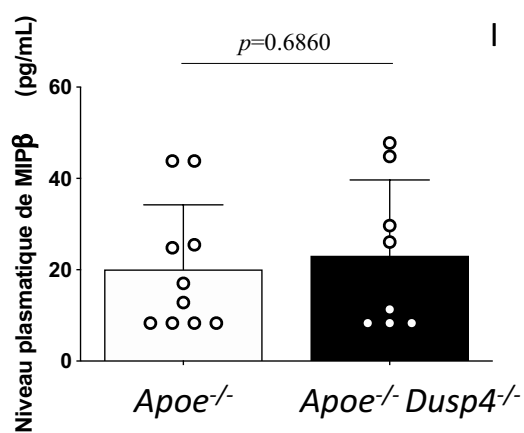
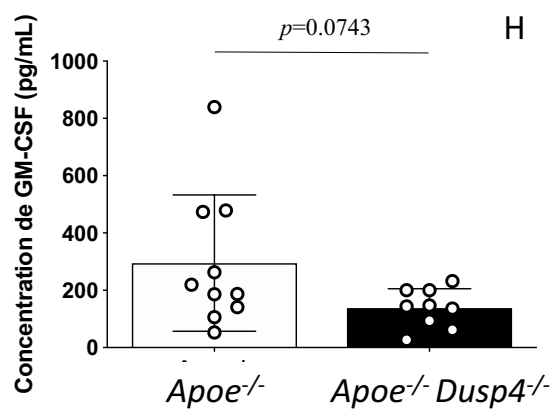
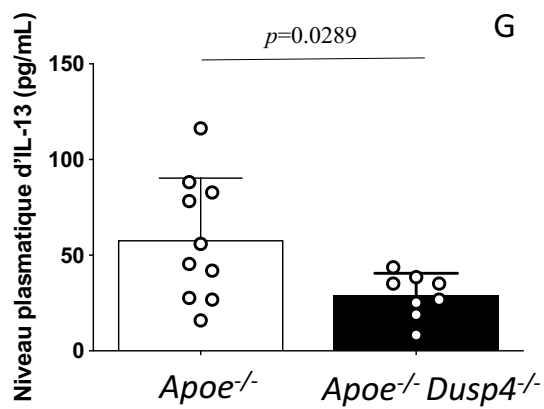
3.1.3. Les effets de DUSP4 sur les niveaux des cytokines/chemokines en circulation

Lors de l'euthanasie des souris, le sang a été récolté au niveau de l'apex du cœur et le plasma a été isolé par centrifugation. Les niveaux de cytokines/chemokines contenues dans le plasma ont été mesurés par *Luminex*. Cette technique a permis d'identifier et quantifier près de 32 molécules différentes sur un même échantillon. Cependant, certains marqueurs inflammatoires chez certaines souris présentaient des niveaux inférieurs au seuil détectable. Ces données ont toutefois été prises en considération et ont été fixées à la valeur du seuil de détection. Nous avons également constaté que les niveaux plasmatiques de certaines molécules inflammatoires pouvaient être très irréguliers d'une souris à l'autre au sein d'un même groupe. La **Figure 17** représente l'ensemble des niveaux plasmatiques issus des groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} (N=10) par l'expérience *Luminex*. Par exemple, deux souris du groupe *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} présentent des niveaux plasmatiques d'IL-1α (**Figure 17D**) de 7822 et 2673 pg/mL comparativement aux autres souris possédant une moyenne de 26,89 pg/mL. Grâce au test ROUT, les valeurs « hors limites » ont été exclues de l'étude. Le groupe de souris *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} présentait un niveau plasmatique d'IL-1α moins élevé, mais statistiquement non significatif que le groupe *Apoe*^{-/-}. Parmi les chemokines étudiées, une diminution de MCP-1 (**Figure 17N**), MIPα (**Figure 17C**), CCL5 (**Figure 17B**) et LIX (**Figure 17M**) ont été observée chez le groupe *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} par rapport au groupe *Apoe*^{-/-}. En revanche les chemokines MIPβ (**Figure 17I**) et MIP-2 (**Figure 17K**) ont présenté des concentrations plus élevées dans le groupe *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} en comparaison du groupe *Apoe*^{-/-}. Une diminution des niveaux plasmatiques des facteurs de croissance G-CSF (**Figure 17L**) et GM-CSF (**Figure 17H**) a été constatée chez le groupe de souris n'exprimant pas DUSP4 en comparaison du groupe *Apoe*^{-/-}. Une diminution des niveaux plasmatiques des cytokines TNFα (**Figure 17F**), IL-6 (**Figure 17A**), d'IL-7, d'IL-9 (**Figure 17E**), d'IL-12p40 (**Figure 17J**) et d'IL-13 (**Figure 17G**) ont été observée chez le groupe *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} en comparaison du groupe *Apoe*^{-/-}.

Les résultats des niveaux plasmatiques d'IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-17, de LIF, de VEGF et de l'IFNγ obtenus avec cette méthode sont majoritairement sous le seuil de

détection établit préalablement par le fournisseur dans les deux groupes de souris étudiés et n'ont donc pas été ajoutés à ce mémoire.





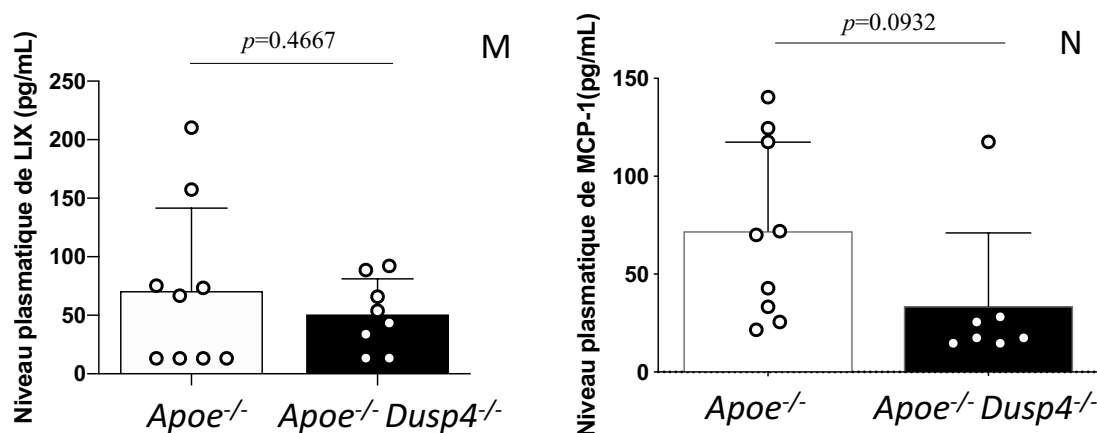


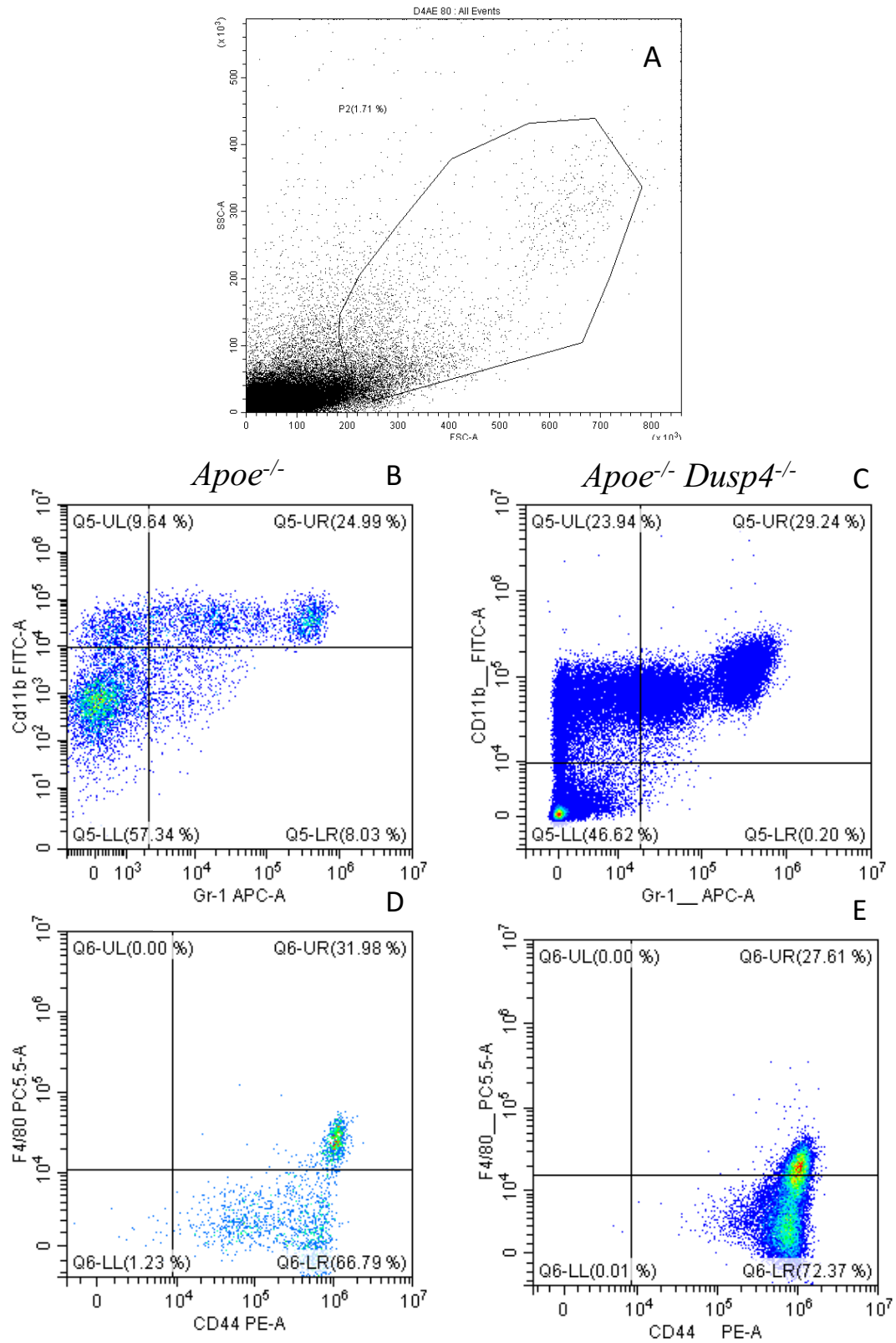
Figure 17 : Les effets de DUSP4 sur les niveaux des cytokines/chemokines en circulation

Niveaux plasmatiques d'IL-6 (A), CCL5 (B), MIP α (C), IL-1 α (D), IL-9 (E), TNF α (F), IL-13 (G), GM-CSF (H), MIP β (I), IL-12p40 (J), MIP-2 (K), G-CSF (L), LIX (M) et MCP-1 (N) des groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} mesurés par *Luminex* (N=10).

3.1.4. Le niveau de monocytes en circulation

La monocyturie, ou le taux de monocytes en circulation, a été mesuré par cytométrie de flux à partir du sang des groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} ayant reçu une diète riche en gras. Dans un premier temps, une première sélection « grossière » des cellules a été réalisée afin d'éliminer les débris cellulaires, une grande partie des lymphocytes et une partie des granulocytes contenue dans les échantillons. Cette sélection a été réalisée en fonction de la granulosité et de la taille des cellules. Cette étape est représentée à la **Figure 18 A**. À partir de la première sélection, une seconde sélection a été réalisée afin d'isoler les granulocytes (comprenant les monocytes) des lymphocytes par sélection positive des cellules Gr-1+/CD11b+. Les **Figures 18 B et 18 C** représentent un exemple de sélection positive des cellules Gr-1+/CD11b+ issus du sang des groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} respectivement. De cette deuxième sélection, une dernière sélection a été réalisée afin de conserver seulement les monocytes capables de se lier à l'endothélium vasculaire, représenté par les cellules F4/80+/CD44+. Un exemple de cette sélection positive est

représenté dans les **Figures 18 D et 18 E**. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les deux groupes de souris concernant aussi bien le pourcentage de granulocyte, soit les cellules Gr-1+/CD11b+, que le pourcentage de monocyte capable de se lier à l'endothélium, correspondant aux cellules F4/80+/CD44+. L'ensemble des résultats obtenus à partir du sang des groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} (N=4) sont représentées dans la **Figure 18 F** pour les cellules Gr-1+/CD11b+ et dans la **Figure 18 G** pour les cellules F4/80+/CD44+.



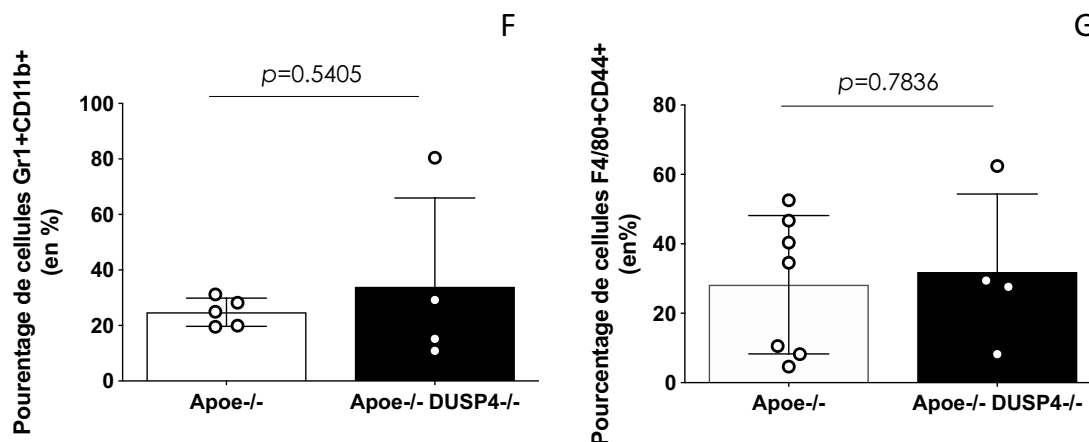


Figure 18 : Le niveau de granulocytes et de monocytes en circulation

FACS représentatif des analyses des cellules plasmatiques (A) ; des cellules CD11b+/Gr-1+ des souris *Apoe*^{-/-} (B) et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} (C) et des cellules F4/80+/CD44+ des souris *Apoe*^{-/-} (D) et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} (E). Pourcentages des cellules CD11b+/Gr-1+ (F) et des cellules F4/80+/CD44+ (G) issu du sang des groupes de souris (N=4-7).

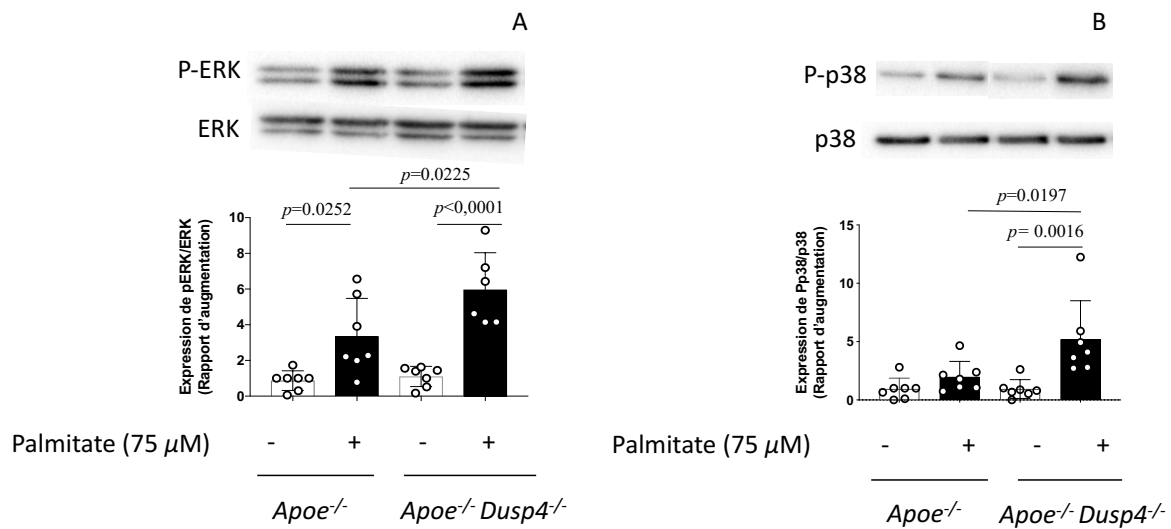
3.2. Projet *ex vivo*

Les macrophages de la cavité intrapéritonéale des groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-} ont été isolés suite à une injection de thioglycolate. Une fois isolés, les macrophages ont été traités avec 75 μ M de palmitate durant 24h. Cette expérience a été réalisée afin de mieux comprendre l'effet de DUSP4 et du palmitate sur l'activation des voies MAPK mais également sur l'expression de la phosphatase elle-même par immunobuvardage et sur l'expression de certaines cytokines/chemokines par PCR quantitatif.

3.2.1. Les effets du palmitate et de DUSP4 sur l'expression de DUSP4 et sur l'activation des MAPK dans les macrophages péritonéaux

Suite à l'extraction des protéines, ces dernières ont été dosées afin d'évaluer l'expression de DUSP4 et l'activation de p38, ERK et JNK par immunobuvardage. Les résultats obtenus par immunobuvardage de l'expression protéique des macrophages péritonéaux (N=4-7)

issus des groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} avec et sans traitement au palmitate sont montrés dans la **Figure 19**. Dans un premier temps, nous avons observé que le palmitate a eu pour effet d'augmenter la phosphorylation de ERK (**Figure 19A**) et de p38 (**Figure 19B**) dans les deux groupes de souris par rapport aux cellules non-traitées. Nous n'avons pas observé d'augmentation de l'activation de JNK (**Figure 19C**) à l'intérieur des macrophages avec le traitement au palmitate. La délétion de DUSP4 a permis de mettre en évidence la suractivation des voies p38 et ERK en l'absence de la phosphatase en combinaison avec le traitement au palmitate. La voie JNK ne semble cependant pas être affectée par la délétion de DUSP4 dans les macrophages péritonéaux. Nous avons observé que le traitement au palmitate augmente l'expression de DUSP4 à l'intérieur des macrophages (**Figure 19D**).



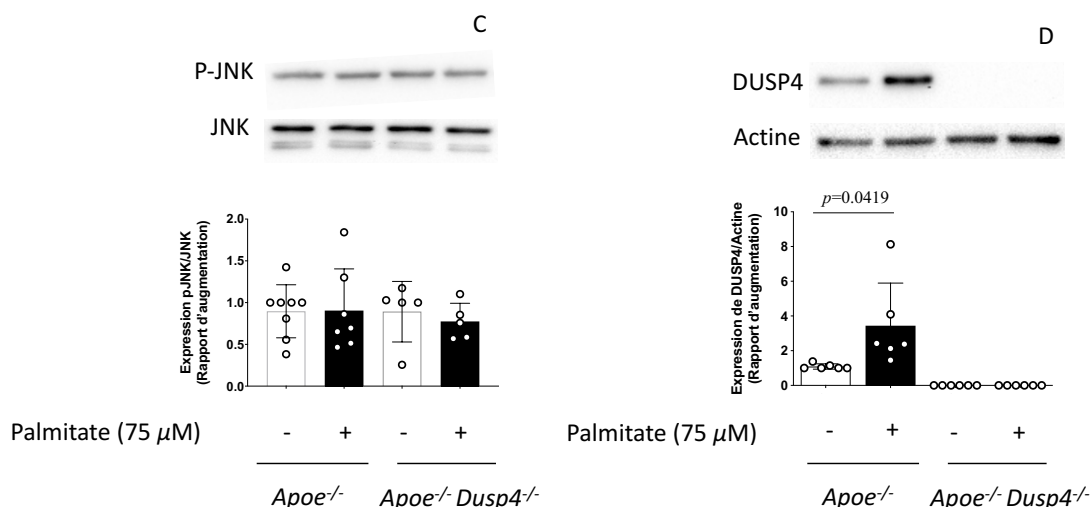


Figure 19 : Les effets du palmitate sur l'expression de DUSP4 et de l'invalidation génétique de DUSP4 sur l'activation des MAPK dans les macrophages péritonéaux

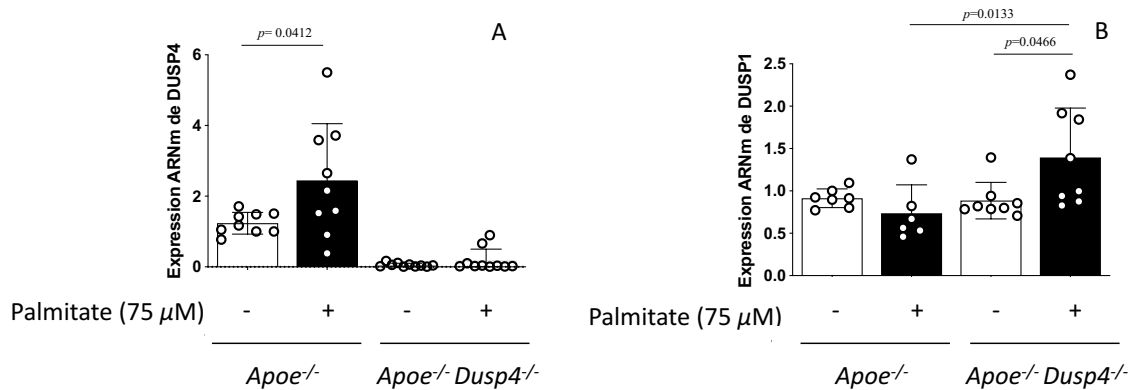
Mesure de l'activation protéique des voies pERK/ERK (A), pp38/p38 (B), pJNK/JNK (C) et de l'expression de DUSP4/actine (D) dans les macrophages péritonéaux traités ou non traités au palmitate par immunobuvardage (N=5-8).

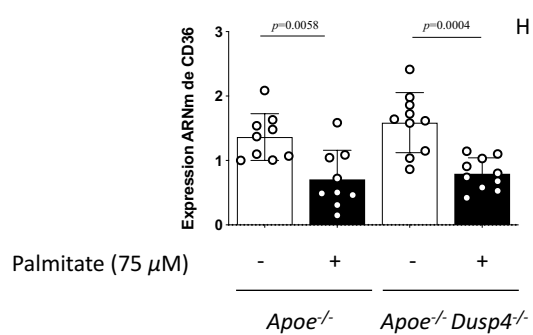
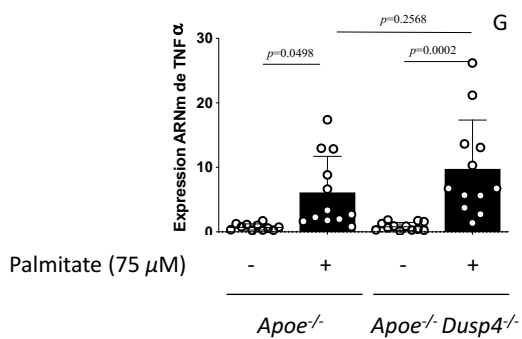
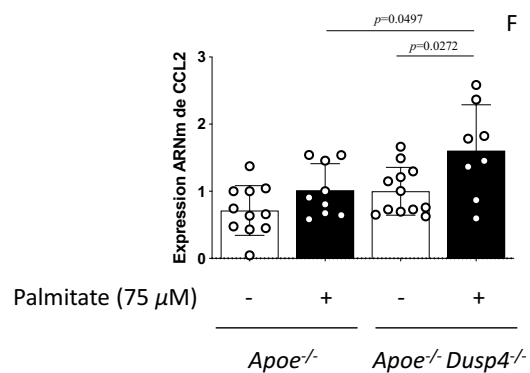
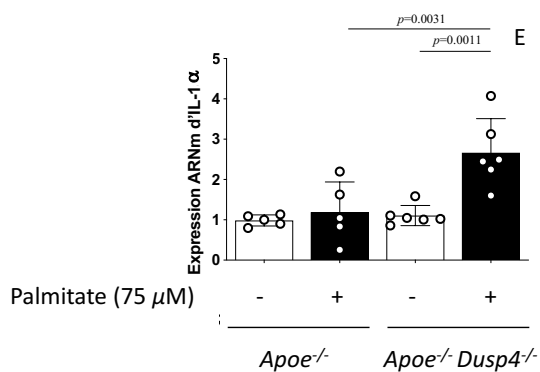
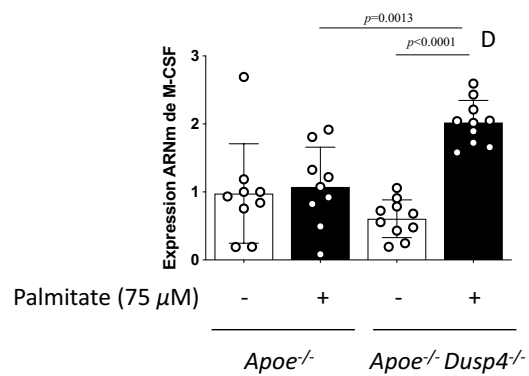
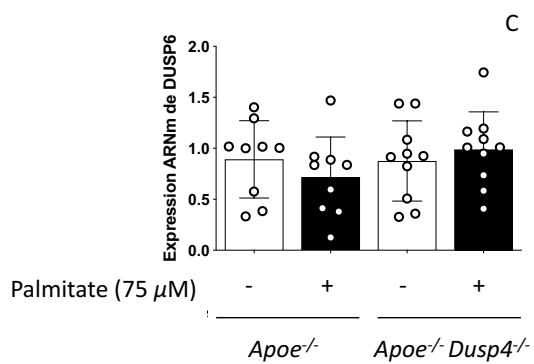
3.2.2. Les effets du palmitate et de DUSP4 sur l'expression des DUSPs et des marqueurs inflammatoires dans les macrophages péritonéaux

L'analyse de l'expression en ARNm par PCR quantitatif de certaines DUSPs et marqueurs inflammatoires a été réalisée afin de mieux comprendre l'effet du palmitate et de la délétion de DUSP4 sur les acteurs clés à l'intérieur des macrophages péritonéaux issus des groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} *Dusp4*^{-/-}. Dans ce contexte, la mesure de l'expression en ARNm de ces phosphatases a été priorisée dans le cadre de ce projet. Le traitement au palmitate n'a eu que peu d'effet sur l'expression de DUSP1 dans les macrophages du groupe de souris *Apoe*^{-/-}. Cependant nous avons observé que l'expression du gène codant pour DUSP1 était significativement augmentée dans les macrophages n'exprimant pas DUSP4 en combinaison avec le traitement au palmitate par rapport aux macrophages issus du groupe

de souris *Apoe*^{-/-} traités (**Figure 20B**). Nous avons observé que l'expression de DUSP4 était augmentée par le palmitate dans les groupes *Apoe*^{-/-} (**Figure 20A**). L'expression de DUSP6 reste cependant inchangée entre les groupes de souris avec ou sans traitement (**Figure 20C**).

Dans un second temps, nous avons pu observer que l'expression de M-CSF était augmentée dans les macrophages issus du groupe *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} traités au palmitate par rapport au groupe *Apoe*^{-/-} (**Figure 20D**). Nous avons observé des résultats similaires sur l'expression d'IL-1 α et de CCL2 (**Figure 20E et 20F**). Le traitement au palmitate a augmenté l'expression de TNF α dans les deux groupes de macrophages (**Figure 20G**). À l'opposé, le traitement au palmitate, dans les macrophages issus des deux groupes de souris, semble entrainer une diminution de l'expression des récepteurs CD36, CXCR4, CCR2 et CX3CR1 (**Figure 20H, 20I, 20J et 20K**). Nous n'avons pas constaté de différence significative entre les deux groupes de souris ayant reçu le traitement palmitate concernant l'expression en ARNm de TNF α , CD36, CXCR4, CCR2 et CX3CR1. Aucun changement n'a été observé pour l'expression CCL5 et IL-1 β entre les deux groupes de souris avec et sans palmitate (**Figure 20L, 20M**).





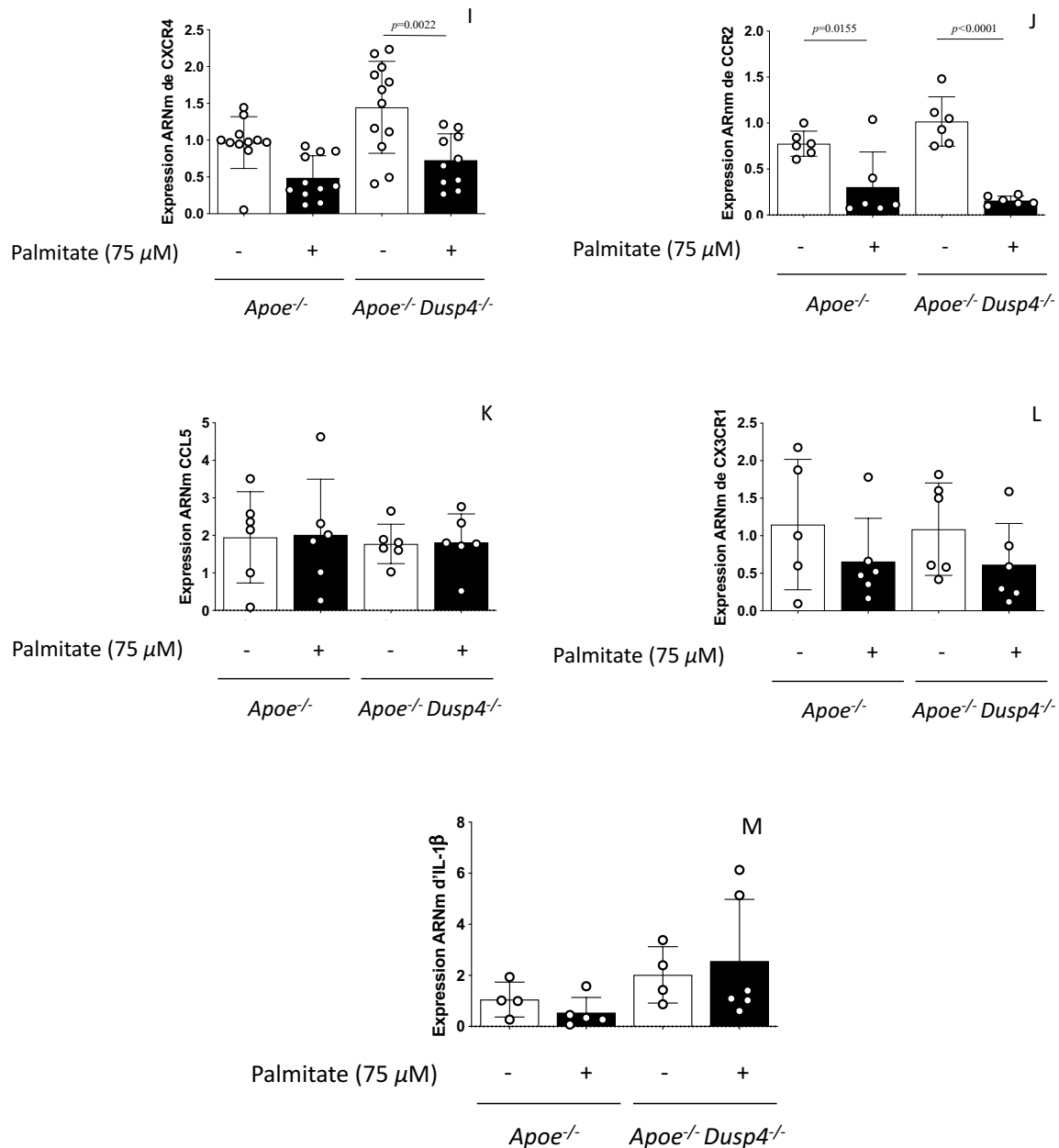


Figure 20 : Les effets du palmitate sur l'expression de DUSP4 et de l'invalidation génétique de DUSP4 sur l'expression ARNm des DUSPs et des marqueurs inflammatoires dans les macrophages péritonéaux

Expression en ARNm de DUSP4 (A), DUSP1 (B), DUSP6 (C), M-CSF (D), IL-1 α (E), CCL2 (F), TNF α (G), CD36 (H), CXCR4 (I), CCR2 (J), CCL5 (K), CX3CR1 (L) et IL-1 β

(M) des macrophages péritonéaux issus des groupes de souris *ApoE*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} et *ApoE*^{-/-} traité avec ou sans palmitate (N=5-12).

Discussion

Effets de la délétion de DUSP4 sur la formation des plaques athérosclérotiques et le profil inflammatoire en circulation

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique se traduisant par une accumulation de cholestérol à l'intérieur de l'aorte. Ce phénomène est favorisé par une hypercholestérolémie chronique retrouvée le plus fréquemment chez les personnes obèses. Pour mieux comprendre les différents mécanismes menant à la formation des plaques, plusieurs modèles murins peuvent être utilisés, mais le modèle *Apoe*^{-/-} reste à ce jour le plus employé. En effet, ce dernier présente une délétion du gène menant à la production de l'apolipoprotéine E qui permet le recyclage des VLDL et des chylomicrons par le foie (voir **section 1.2.3.**). Cette modification entraîne une augmentation du taux de cholestérol en circulation et induit la formation spontanée des plaques, et l'utilisation d'une diète riche en gras permet d'accélérer le processus athérogène.

La technique de coloration en phase *Oil red O* permet de mettre en évidence l'accumulation de gras à l'intérieur des tissus. Grâce à cette technique, des études ont démontré l'implication de DUSP1 dans le développement des plaques athérosclérotiques chez la souris *Apoe*^{-/-}. Elles ont pu mettre en évidence qu'une délétion systémique de DUSP1 corrèle avec une importante diminution des plaques dans l'aorte des souris par rapport au groupe *Apoe*^{-/-} (Shen *et al.*, 2010 ; Imaizumi *et al.*, 2010). À la suite de ces résultats, nous avons voulu comprendre si la délétion de DUSP4 dans un modèle de souris proathérogène présente les mêmes conclusions. Nous avons démontré qu'une délétion de DUSP4 entraîne une diminution de l'accumulation des plaques à l'intérieur de l'aorte comparativement au groupe de souris *Apoe*^{-/-} (voir **Figure 15**).

De nombreuses études utilisent plusieurs marquages immunohistologiques de la BCA ou de la crosse aortique, afin d'observer le rétrécissement de la lumière artérielle et l'infiltration des cellules immunitaires. Pour évaluer ces phénomènes nous avons utilisé le marquage au trichrome de Masson pour observer le rétrécissement de la lumière artérielle et le marquage α -SMA/Mac-2 pour l'infiltration des macrophages. Nos observations ont mis en évidence que la délétion de DUSP4 induit un rétablissement de la lumière artérielle

et une diminution de l'infiltration des macrophages à l'intérieur de la BCA par rapport au groupe *Apoe*^{-/-}. Comme décrit dans la **section 1.3.1.**, l'athérosclérose est initiée notamment par une augmentation de l'infiltration des macrophages à l'intérieur de l'artère et la progression de ce phénomène provoque un rétrécissement de la lumière artérielle. Nous pouvons ainsi constater que la diminution de l'infiltration des macrophages et l'augmentation du diamètre de la lumière artérielle que l'on observe par immunomarquage corrélient avec la diminution des plaques athérosclérotiques observée avec la technique *Oil red O* chez le groupe de souris *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-}.

Les groupes de recherche étudiant l'impact de DUSP1 sur le processus d'athérosclérose utilisent un immunomarquage de DUSP1 à l'intérieur des plaques athérosclérotiques. Cette méthode a été réalisée dans le but de mieux localiser l'activité de la phosphatase et ainsi cibler leurs travaux de recherche. Cette stratégie pourrait être envisagée dans notre cas afin de mieux localiser l'expression DUSP4 à l'intérieur des plaques athérosclérotiques. Cette méthode nous permettrait d'obtenir des conclusions intéressantes, mais elles restent à prendre avec des précautions. Une étude a démontré que l'expression de DUSP1 était plus importante dans les cellules myéloïdes infiltrées à l'intérieur des plaques de la crosse aortique des souris *Apoe*^{-/-} (Shen *et al.*, 2010). À la suite de ces résultats, le groupe de recherche a pris la décision de se concentrer sur ce type cellulaire en transplantant des monocytes *Dusp1*^{-/-} à l'intérieur des souris *Apoe*^{-/-} afin d'induire une délétion de DUSP1 spécifiquement dans les cellules myéloïdes (*Apoe*^{-/-}*Dusp1*^{my/-}). Cette expérience a été effectuée avec l'hypothèse que le groupe de souris *Apoe*^{-/-}*Dusp1*^{my/-} présenterait les mêmes résultats que la délétion systémique de DUSP1, soit une diminution du pourcentage de plaque par rapport au groupe de souris contrôle *Apoe*^{-/-}. Contrairement à leur hypothèse de départ, les souris *Apoe*^{-/-}*Dusp1*^{my/-} ont développé plus de plaques que les souris *Apoe*^{-/-}*Dusp1*^{-/-} et *Apoe*^{-/-} (Shen *et al.*, 2010). En 2015, une équipe utilisant un modèle murin *Ldlr*^{-/-}*Dusp1*^{my/-} a également démontré que la délétion de cette phosphatase dans les cellules myéloïdes provoque une augmentation du pourcentage de plaque à l'intérieur de l'aorte comparativement au groupe contrôle *Ldlr*^{-/-} (Kim *et al.*, 2016).

La mesure des cytokines/chemokines en circulation par ELISA ou *Luminex* permet de mettre en valeur les niveaux plasmatiques de nombreux marqueurs inflammatoires clés pouvant influencer le processus athérogène. Par cette technique, des études ont démontré

que la délétion de DUSP1 entraînait une diminution de la concentration plasmatique de TNF α , d'IL-1 α (Shen *et al.*, 2010 ; Imaizumi *et al.*, 2010) et de MCP-1 (Imaizumi *et al.*, 2010), des facteurs pro-inflammatoires importants dans le développement de l'athérosclérose (Fatkhullina *et al.*, 2016). Nous avons également démontré que le groupe de souris n'exprimant pas DUSP4 présentait une diminution (non significative) de ces trois molécules comparativement au groupe *Apoe*^{-/-}. Nous avons aussi observé une importante diminution de l'expression chez le groupe de souris *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} d'IL-2, d'IL-6, d'IL-9, d'IL-12p70, d'IL-17, de CCL5, de MIP-1 (CCL3) et de G-CSF, d'autres molécules pro-inflammatoires par rapport au groupe de souris *Apoe*^{-/-}.

Cependant, le groupe de souris *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} présente également une diminution de la concentration plasmatique d'IL-13 par rapport au groupe *Apoe*^{-/-}. De manière générale, une diminution des facteurs anti-inflammatoires corrèle avec une augmentation du processus inflammatoire. La diminution significative d'une seule cytokine anti-inflammatoire ne peut servir de conclusion concernant l'équilibre inflammatoire. Une étude a observé une augmentation de l'expression d'IL-10 chez les souris *Apoe*^{-/-}*Dusp1*^{-/-} âgées de deux et trois mois par rapport au groupe *Apoe*^{-/-} du même âge (Shen *et al.*, 2010). À partir de 4 mois d'âge, ils ont constaté une importante diminution de cette cytokine chez les souris n'exprimant pas la phosphatase par rapport aux souris du même groupe moins âgé. Cette étude a permis de mettre en évidence la fonction principale de la cytokine IL-10, qui est de réguler la réponse inflammatoire. En effet, une fois l'inflammation stimulée et la menace écartée, IL-10 est sécrétée afin de diminuer ce phénomène et de retourner à un état de repos avant le début d'une nouvelle infection. Cette étude nous permet de considérer l'importance d'étudier le facteur temporel avant d'interpréter les résultats des marqueurs inflammatoires en circulation.

De manière générale, nous avons constaté que la délétion de DUSP4 chez la souris entraîne une diminution du niveau de certaines cytokines pro-inflammatoires dans le plasma en comparaison avec des souris *Apoe*^{-/-}. La baisse de ces marqueurs inflammatoires chez le groupe *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} est en adéquation avec la diminution de pourcentage de plaques observées chez ce même groupe.

La technique de cytométrie de flux se basant sur les propriétés intrinsèques et induites de la cellule permet de caractériser, de trier et de quantifier les cellules selon leur taille, leur

granulosité et selon l'expression d'antigènes cibles. Dans le cadre de ce projet, nous voulions mieux comprendre les effets de DUSP4 sur le taux de monocyte en circulation. À partir du plasma des souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-}, nous avons effectué un marquage avec les anticorps F4/80, Cd11b, Gr-1 et CD44L. Nos résultats n'ont démontré aucune différence concernant le taux de monocyte en circulation entre les deux différents groupes de souris. L'utilisation de cette technique nous a permis d'observer que DUSP4 ne semble pas affecter le taux de monocyte en circulation. Une diminution du taux de monocyte en circulation chez les souris *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} aurait pu corrélérer avec une diminution de la pathologie que l'on observe avec l'expérience *Oil red O*.

L'utilisation d'un marqueur Ly6C aurait pu nous permettre d'en savoir plus sur la polarisation des macrophages. En effet, ce dernier est un antigène exprimé spécifiquement à la surface des macrophages et son niveau d'expression corrèle avec le type d'activation des macrophages M1 (Ly6C^{hi}) et M2 (Ly6C^{lo}). Une étude a démontré une prédominance des monocytes de types M1 chez les souris hypercholestérolémiques. Cette étude a également constaté une augmentation de l'adhésion et de l'infiltration de ce type de cellule à l'intérieur des artères (Swirski *et al.*, 2007). Un changement dans la balance qui équilibre les sous-populations de monocytes peut influencer le processus inflammatoire et serait donc utile à étudier dans l'avenir.

Effets du palmitate sur les macrophages péritonéaux de souris

Les patients obèses présentent, dans la plupart des cas, des taux élevés de cholestérol et de triglycérides en circulation, on parle alors de dyslipidémie. Une alimentation riche en gras, le manque d'activité physique, certains facteurs héréditaires et le tabagisme font partie des principales causes menant aux différentes formes de dyslipidémies (voir **section 1.2.4.**). Ces dernières favorisent l'infiltration des LDL à l'intérieur de l'aorte, instiguant ainsi le développement de l'athérosclérose.

Les effets lipotoxiques des AG saturés, comme le palmitate, sont impliqués dans le dysfonctionnement endothélial, l'activation des macrophages, la synthèse des molécules pro-inflammatoires ainsi que dans les mécanismes d'apoptose (Korbecki *et al.*, 2019). Dans le cadre de ce projet, nous avons voulu mieux comprendre l'effet du palmitate sur les

macrophages et sur les cytokines/chemokines qu'ils produisent. Nous avons également étudié l'impact du traitement au palmitate sur l'activation des voies MAPK et sur l'expression des DUSPs. Pour des raisons de clarté, les prochaines lignes seront dédiées seulement à l'interprétation des résultats du traitement palmitate sur les macrophages du groupe de souris *Apoe*^{-/-} (voir **Figures 19 et 20**).

Nous avons constaté une augmentation significative de l'expression de DUSP4 dans les macrophages traités au palmitate par rapport aux cellules non traitées. Nous avons également remarqué que le palmitate a induit l'activation des voies ERK et p38. L'augmentation de DUSP4 dans les macrophages traités nous laisse croire que son rôle inhibiteur diminuerait l'activation des voies p38 et ERK et non l'inverse comme nous l'observons. Cependant, ces observations peuvent s'expliquer par le rôle régulateur des MAPK sur DUSP4. En effet, l'activation de p38 et ERK peut entraîner l'augmentation de l'expression de DUSP4 (voir **section 1.8.3**), mais l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de ERK et/ou de p38 permettrait de vérifier cette boucle de régulation. Peu d'études ont été réalisées concernant les effets du palmitate sur l'activation de p38 et ERK à l'intérieur des macrophages. L'activation de la voie p38 est la plupart du temps associée à une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages. En effet, une étude a démontré que le palmitate induit l'activation de la voie TLR4/NFκB participant à la production des métalloprotéases et entraîne l'augmentation de la production d'IL-1α, du TNFα, de CCL2 et de CCL4 par les macrophages (Korus *et al.*, 2002 ; Sindhu *et al.*, 2016). L'activation de la voie ERK est la plupart du temps associée à l'activation des mécanismes de prolifération et de différenciation (voir **section 1.7.1**). L'activation de cette voie par le palmitate vient contredire les effets pro-apoptotiques de ce dernier sur les macrophages (voir **section 1.9**). À ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur les effets de l'activation de ERK par le palmitate et la prolifération cellulaire. Nous avons observé que le traitement au palmitate n'a pas eu d'effet sur l'activation de la voie JNK. Les effets lipotoxiques du palmitate se manifestent notamment par une augmentation des mécanismes d'autophagie et d'apoptose afin de s'en protéger. Ces mécanismes sont notamment influencés par l'activation de la voie JNK (voir **section 1.9**). Une quantification de la prolifération cellulaire et de l'apoptose cellulaire pourrait être réalisée

à l'avenir pour mieux comprendre l'activation de ces voies MAPK sur ces mécanismes cellulaires à l'intérieur des macrophages.

Pour mieux comprendre les effets du palmitate sur l'inflammation induite par les macrophages murins, nous avons mesuré l'expression en ARNm de certains marqueurs inflammatoires clés par RT-qPCR. Parmi les gènes étudiés, nous avons observé une augmentation significative de l'expression du TNF α dans les macrophages traités au palmitate et issus du groupe de souris *Apoe*^{-/-} par rapport aux cellules non traitées. Cette cytokine pro-inflammatoire participe à la chemotaxie et à l'adhésion cellulaire en régulant l'expression de MCP-1, d'ICAM-1 et de VCAM-1 (voir **section 1.6.2.**). Une étude a montré que l'activation de p38 corrèle avec une augmentation de la synthèse de TNF α dans les macrophages (Parameswaran *et al.*, 2010). La combinaison de nos résultats obtenus par immunobuvardage sur l'activation de p38 par le palmitate et par qPCR sur l'expression de TNF α est en adéquation avec l'étude mentionnée précédemment. Pour mieux comprendre et confirmer l'impact du palmitate sur l'axe p38/TNF α , l'utilisation d'un inhibiteur de p38 permettrait de savoir si l'activation de cette voie s'avère indispensable à la production du TNF α dans nos conditions. Toujours par qPCR, nous avons constaté que l'expression des récepteurs membranaires CD36, CXCR4, CCR2 et CX3CR1 était diminuée dans les macrophages traités au palmitate issu du groupe de souris *Apoe*^{-/-} comparativement aux cellules non traitées. Le récepteur CD36 fait partie des récepteurs membranaires impliqués dans la phagocytose des lipides participant notamment à la formation des cellules spumeuses (Pepino *et al.*, 2014). Afin de comprendre le rôle protecteur de l'acide oléique, une étude a voulu comparer ses effets par rapport au palmitate en évaluant entre autres l'expression de CD36. Le groupe de recherche a observé une augmentation de l'expression de CD36 et de l'apoptose à la suite du traitement palmitate, provoquant également une augmentation de la production des ROS et du stress du réticulum endoplasmique (Kim *et al.*, 2017). Les résultats obtenus par cette étude sont en opposition avec nos observations, mais les concentrations utilisées par cette équipe sont de 500 μ M de palmitate, donc nettement supérieures à nos conditions expérimentales. Cette même étude a mesuré l'expression de CD36 à des concentrations variables de palmitate et il a été observé que l'augmentation de CD36 n'était visible qu'à partir de 200 μ M. Un autre groupe de recherche a observé cette fois une diminution de l'expression de CD36 dans les

macrophages péritonéaux avec un traitement de 100 μ M et 250 μ M de palmitate durant 24 h (Liang *et al.*, 2004). Un autre élément à prendre en considération est la préparation du palmitate. Le groupe de recherche de la première étude mentionnée n'hésite pas à diluer le palmitate dans l'éthanol et la deuxième étude utilise comme nous la BSA. Cette différence de préparation pourrait avoir une conséquence dans l'incorporation du palmitate par les macrophages et ainsi en modifier ses effets. Le récepteur CXCR4 participe à la chemotaxie des monocytes et à l'activation des macrophages M4 (voir **section 1.6.2.**). Aucune étude à ce jour n'a été effectuée concernant l'impact d'un traitement au palmitate sur l'expression de CXCR4 dans les macrophages. Cependant, dans ce type cellulaire, une étude a démontré qu'une délétion de CXCR4 induit une diminution de l'expression du TNF α et d'IL-6 ainsi qu'une diminution de l'activation de p38 et ERK (Tian *et al.*, 2019). Les résultats que nous avons obtenus avec le traitement au palmitate nous montrent des effets inverses. En effet, nous avons observé que le palmitate induit une diminution de l'expression de CXCR4, mais une augmentation de l'activation de p38, ERK et de l'expression du TNF α . Le rôle du palmitate sur l'expression de CXCR4 reste encore à élucider.

Les récepteurs CCR2 et CX3CR1 font partie des récepteurs aux chemokines clés dans l'étape de chemotaxie des monocytes menant à la formation des plaques athérosclérotiques (voir **section 1.6.1.**). Une étude en 2019 a démontré que le palmitate provoque une augmentation de l'expression de MCP-1 et de son récepteur au sein des macrophages (Wang *et al.*, 2019). On peut constater que cette étude ne vient pas appuyer nos observations expérimentales. Cependant, cette publication utilise une lignée de macrophage RAW 264.7 traités avec 100 μ M de palmitate préparé à partir d'une solution NaOH/éthanol qui pourrait influencer et expliquer la divergence de résultats obtenus. À ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur l'effet du palmitate sur l'expression de CX3CR1 dans les macrophages. Cependant le rôle de ce récepteur a déjà été mis en évidence dans ce type cellulaire. En effet, un groupe de recherche a démontré que l'activation du récepteur CX3CR1 par son ligand CX3CL1 permet l'extravasation des monocytes inflammatoires à l'intérieur de l'aorte de souris *Apoe*^{-/-} (Tacke *et al.*, 2007). La détermination du rôle du palmitate sur l'expression de l'axe CX3CR1/CX3CL1 dans les macrophages permettrait de mieux comprendre l'impact de la dyslipidémie sur l'étape d'extravasation menant à la formation des plaques athérosclérotiques.

Nous avons observé une importante variabilité concernant nos résultats de RT-qPCR (voir **Figure 20**). Plusieurs explications peuvent expliquer ces variations. D'une part, il s'agit de macrophages issus de différentes souris, ce qui peut entraîner une réponse au traitement d'une souris à l'autre. D'autre part, nous avons constaté que l'efficacité du palmitate diminuait au fil du temps, ce qui aurait également pu influencer l'incorporation de ce dernier dans les cellules et ainsi moduler différemment l'expression des marqueurs inflammatoire. Nous avons utilisé la technique d'extraction par le *Tri-Reagent* pour isoler l'ARNm des macrophages péritonéaux. Malheureusement, nous avons également connu plusieurs difficultés concernant la pureté et la qualité de l'ARN isolé, ce qui pourraient influencer la validité de nos résultats de qPCR.

De manière générale, nous avons remarqué une diminution de l'expression en ARNm de certains marqueurs pro-inflammatoires comme CCR2 et CX3CR1 avec le traitement au palmitate. Nous avons également observé une diminution de l'expression de CD36 dans les mêmes conditions. Comme mentionné dans la **section 1.9**, le palmitate est généralement associé à une augmentation de la sécrétion de plusieurs facteurs pro-inflammatoires par les macrophages. En raison des incertitudes liées à notre technique d'extraction d'ARNm, les résultats que nous avons obtenus par qPCR sont à prendre avec précaution. Cependant, il faut également prendre en considération que les effets du palmitate dénotés dans la littérature sont propres au temps de stimulation, au protocole utilisé pour la préparation et également à la concentration utilisée.

Effets de la délétion de DUSP4 sur les macrophages péritonéaux de souris

L'utilisation du thioglycolate nous a permis de récolter les macrophages murins présentant une délétion de DUSP4 et ainsi mieux comprendre son rôle au sein de la pathologie.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'impact de cette délétion, combinée à un traitement au palmitate, sur l'activation des voies MAPK par immunobuvardage (voir **Figure 19**). Nous avons observé une augmentation de l'activation de ERK et de p38 dans les macrophages issus des souris *Apoe^{-/-}Dusp4^{-/-}* traitées au palmitate par rapport aux macrophages issus des souris *Apoe^{-/-}* traitées. Ces résultats viennent appuyer le rôle inhibiteur de DUSP4 sur les voies p38 et ERK spécifiquement.

Une étude a déjà mis en évidence le rôle inhibiteur de DUSP4 sur la voie ERK, mais n'a cependant pas observé ces effets sur la voie p38 dans les macrophages (Neamatallah *et al.*, 2019). À noter que ce groupe de recherche a utilisé un traitement au M-CSF des macrophages *Dusp4*^{-/-} et non un traitement au palmitate. En effet, nous avons pu observer, comme avec le M-CSF, que l'augmentation de la phosphorylation d'ERK et de p38 est visible seulement en présence de palmitate dans les macrophages issus des souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-}.

Nos résultats obtenus *ex vivo* par immunobuvardage sur l'activation de ERK et p38 viennent contredire nos observations *in vivo* chez nos deux groupes de souris. En effet, l'utilisation de ces voies de signalisation est majoritairement associée à une augmentation du processus inflammatoire menant à la formation des plaques (Reustle *et al.*, 2018). Plusieurs pistes d'explications peuvent être envisagées. Dans un premier temps, l'augmentation des voies MAPK a été observée à la suite du traitement palmitate dans les macrophages issus des deux groupes de souris. *In vivo*, la diète riche en gras donnée aux groupes de souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} est constituée de plusieurs types d'AG qui pourraient influencer l'activation des voies MAPK (Davanson *et al.*, 2020). Une étude a démontré que l'activation de p38 dans les macrophages était différente selon le type d'AG utilisé comme traitement. Par exemple, ils ont souligné que l'acide docosahexaénoïque active moins la voie p38 que l'acide linoléique (Li *et al.*, 2020). Dans un second temps, il est possible que la diminution des plaques observée chez les souris n'exprimant pas DUSP4 puisse s'expliquer dans d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales ou dans les cellules musculaires lisses. Par exemple, une étude a démontré qu'une délétion de DUSP6 dans les cellules endothéliales aortiques de souris entraînait une importante diminution de l'expression de molécules d'adhésion (Hsu *et al.*, 2018).

Nous avons constaté que l'expression en ARNm de M-CSF, IL-1 α , DUSP1 et CCL5 augmentait dans les macrophages issus des souris *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} traitées au palmitate par rapport aux cellules issues des souris *Apoe*^{-/-} traitées (voir **Figure 20**).

À ce jour, deux études ont mis en évidence le rôle proathérogène de DUSP1 *in vivo* (Imaizumi *et al.*, 2010 ; Shen *et al.*, 2010). Ces dernières ont démontré qu'une délétion systémique de DUSP1 dans un modèle de souris *Apoe*^{-/-} génère une diminution du processus athérogène en comparaison avec le groupe de souris *Apoe*^{-/-}. Dans les

macrophages, DUSP4 et le palmitate semblent avoir un effet positif sur l'expression de DUSP1, mais le lien avec l'athérosclérose reste encore à approfondir. Nous savons que la délétion de DUSP4 dans les macrophages traités entraîne une suractivation de la voie ERK et p38 en comparaison avec les macrophages *Apoe*^{-/-} ayant également reçu un traitement au palmitate. L'activation des voies MAPK provoque l'augmentation de l'expression des DUSPs (voir **Figure 12**), ce qui pourrait expliquer l'augmentation de l'expression de DUSP1 que nous avons observé dans les macrophages *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} traités au palmitate. Une augmentation de l'expression de M-CSF favorise le recrutement, la différenciation et la prolifération des macrophages (voir **section 1.5.2.**). La stimulation des macrophages par M-CSF ou par GM-CSF n'a pas le même effet sur leur activation. Une étude a démontré que les macrophages produisent plus de cytokines anti-inflammatoires sous l'influence de M-CSF que sous l'influence de GM-CSF (Riera-Borrull *et al.*, 2017). L'augmentation de cette molécule que nous observons pourrait nous indiquer une polarisation M2 des macrophages, ce qui pourrait corrélérer avec une diminution du processus d'athérosclérose observé chez les souris *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-}. Cependant, l'augmentation de l'expression d'IL-1 α et CCL2 observée dans les macrophages issus des souris *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} vient contredire cette hypothèse. En effet, l'implication d'IL-1 α dans l'initiation de l'athérosclérose et de CCL2 dans l'étape de chemotaxie (voir la **section 1.6**) ne vient pas justifier cette hypothèse. La mesure d'autres marqueurs anti-inflammatoires comme IL-4 ou IL-13 par exemple serait nécessaire afin d'établir un profil M1/M2 des macrophages. La délétion de DUSP4 n'a pas eu d'effet sur l'expression des autres marqueurs inflammatoires étudiés, soit CD36, CXCR4, IL-1 β , CCR2 ou CCL5.

Perspectives

Le rôle de DUSP4 dans la fonctionnalité des monocytes/macrophages menant à la formation des plaques athérosclérotiques.

Nos résultats présentés à ce jour ont mis en évidence l'impact du palmitate et de la délétion de DUSP4 dans les macrophages murins sur l'expression de certains marqueurs inflammatoires et sur l'activation des voies de signalisation cellulaire MAPK. Cependant l'impact de DUSP4 sur la fonctionnalité de ces cellules reste à approfondir.

L'étape de chemotaxie pourrait être étudiée à l'avenir par notre équipe. Une étude menée par notre laboratoire a été réalisée afin d'évaluer le rôle de l'activation de PKC- β sur le dysfonctionnement endothélial. Dans cette étude nous avons évalué les effets du palmitate et d'un traitement élevé en glucose sur l'adhésion des THP-1 (monocyte humain) sur des cellules endothéliales aortiques bovines (BAEC). Dans cette étude, la co-culture de ces deux types cellulaires a été utilisée afin d'évaluer le pourcentage de monocytes ayant adhéré aux BAEC. Dans le cadre de ce projet, cette stratégie nous permettrait de mieux comprendre le rôle du palmitate et de DUSP4 sur l'adhésion cellulaire mais également d'observer les effets de la délétion de DUSP4 aussi bien sur les molécules d'adhésions exprimées à la surface des cellules endothéliales que ceux exprimées à la surface les monocytes. La délétion de DUSP4 dans les BAEC pourraient être réaliser à l'aide d'adénovirus ciblant spécifiquement le gène menant à l'expression de la phosphatase. Cependant les monocytes ne possédant pas de récepteur au adénovirus, l'utilisation d'un *siRNA* serait plus judicieuse pour déléter DUSP4 dans ce type de cellule.

La différenciation des monocytes et leur activation sont des étapes clés dans le développement des plaques. En effet des études ont révélé qu'une perturbation de la balance entre ces deux types de monocytes influençait le processus inflammatoire menant à la formation des plaques athérosclérotiques. L'isolation des plaques contenues dans l'aorte des souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} combinée à un marquage spécifique de Ly6C (marqueur M1/M2), pourrait nous permettre de mieux comprendre les effets de la délétion de DUSP4 sur la polarisation des macrophages. En effet, une augmentation de la population des macrophages M2 anti-inflammatoires dans le groupe de souris *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} par

rapport au groupe *Apoe*^{-/-}, nous permettrait de mieux expliquer la diminution du pourcentage de plaque observée *in vivo*.

Dans un futur plus rapproché, notre laboratoire veut investiguer l'impact de la délétion de DUSP4 spécifiquement dans les cellules myéloïdes par transplantation de monocyte *Dusp4*^{-/-} dans le groupe de souris *Apoe*^{-/-}. Cette méthode nous permettra de mieux comprendre le rôle de DUSP4 sur les cellules myéloïdes.

Le rôle de DUSP4 dans le dysfonctionnement endothélial.

Le dysfonctionnement endothélial est l'étape d'initiation de l'athérosclérose et se traduit notamment par une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, par une augmentation de la sécrétion des chemokines et de la production des ROS par les cellules endothéliales (voir **section 1.3.1.**). Une culture *in vitro* des cellules endothéliales, combinée à une technique de transfection induisant la délétion de DUSP4, nous permettrait de mieux comprendre le rôle de la phosphatase sur la fonctionnalité de ces cellules. La mise en culture des cellules endothéliales de l'aorte des souris *Apoe*^{-/-} et *Apoe*^{-/-}*Dusp4*^{-/-} serait également une technique envisageable. La mesure de l'expression de certaines molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales par qPCR, nous permettrait de mieux comprendre le rôle de DUSP4 sur l'adhésion cellulaire. En effet, la diminution de l'expression d'une ou plusieurs molécules d'adhésions, intégrines ou sélécines à la surface des cellules endothéliales *Dusp4*^{-/-} pourrait être une piste d'explication à nos résultats obtenus *in vivo*.

Autres perspectives

L'injection intrapéritonéale du thioglycolate est une technique permettant de récolter jusqu'à 30 millions de macrophages à partir d'une seule souris. Cette technique nous a également permis d'obtenir des macrophages n'exprimant pas DUSP4. Cependant malgré sa simplicité et son efficacité, une question reste en suspens : « Est-ce que les effets du thioglycolate influencent le processus inflammatoire ? ». Afin d'éviter cette interrogation,

une autre technique qui consiste à isoler les monocytes directement à partir de la moelle osseuse des souris pourrait être utilisée à l'avenir.

L'hypercholestérolémie étant l'une des principales causes liées au développement de l'athérosclérose, la grande majorité des études *in vitro* utilisent un traitement à base de LDL ou de oxLDL. Ces lipoprotéines se retrouvent en grande majorité à l'intérieur des plaques athérosclérotiques et seraient un stimulus plus approprié pour l'avenir de ce projet pour la culture des macrophages.

Conclusion

Notre étude a permis de mettre en évidence l'importance de DUSP4 dans le développement de l'athérosclérose. À ce propos, nous avons démontré que sa délétion entraîne une diminution du pourcentage de plaque à l'intérieur de l'aorte. Nous avons également constaté une augmentation du diamètre de la lumière artérielle chez les souris *Apoe^{-/-}Dusp4^{-/-}* et une diminution de l'infiltration des macrophages à l'intérieur de l'aorte en comparaison des souris *Apoe^{-/-}*. Dans le sang, nous avons observé une diminution de certains marqueurs pro-inflammatoires dans le groupe *Apoe^{-/-}Dusp4^{-/-}* comparativement au groupe *Apoe^{-/-}*. À l'intérieur des macrophages murins, nos résultats ont démontré que le palmitate active les voies ERK, p38 et augmente l'expression de DUSP4. Toujours dans les mêmes conditions, nous avons remarqué que la délétion de DUSP4 entraîne une suractivation de ERK et p38. Nous avons remarqué également une augmentation de l'expression du TNF α et une diminution de CD36, CXCR4, CCR2, CX3CR1 avec le traitement au palmitate. Une augmentation de l'expression de M-CSF, IL-1 α et CCL5 dans les macrophages n'exprimant pas la phosphatase et traités au palmitate a été observé.

Cependant, nos résultats obtenus *ex vivo* sur l'expression de certains marqueurs inflammatoires ne mettent pas encore en évidence un mécanisme clair pouvant expliquer nos résultats *in vivo*. Notre principal objectif était dirigé vers l'activité des macrophages, mais l'aspect fonctionnel de ces derniers n'a cependant pas encore été exploré dans le cadre de ce projet. Pour la suite de ce projet, des expériences devront être orientées dans ce but afin de mieux comprendre le rôle de DUSP4 dans le processus inflammatoire menant à la formation des plaques athérosclérotiques. D'autres types cellulaires pourraient également être à l'étude afin de mieux comprendre le rôle de cette phosphatase dans le développement de la maladie.

Remerciement

Pour commencer, je tiens à remercier mon directeur de recherche Pedro Geraldès pour l'opportunité qu'il m'a donné de réaliser ce projet pour l'obtention de ma maîtrise. Il m'a permis de découvrir le monde de la recherche scientifique, ce qui m'a énormément enrichi d'un point de vu intellectuel et humain. Les valeurs que j'ai acquises toutes au long de mon passage au sein du laboratoire Geraldès me serviront pour le reste de ma vie.

Ce projet se concentrant en partie sur la science immunologique, il aurait été inimaginable de ne pas remercier le professeur Abdelaziz Amrani et son équipe pour leurs importantes contributions. L'écoute, les conseils et la patience du professeur Amrani ont été des éléments clés dans le déroulement de mon parcours universitaire.

Il est certain qu'il aurait été très difficile pour moi de mener à bien ce projet sans l'aide de mes mentors, mais la tâche aurait été encore plus complexe sans l'aide, le soutien et les conseils précieux de mes camarades de laboratoire : David-Alexandre, Stéphanie, Marina, Valérie, Crysta, Tristan et Clément.

Un soutien important a également été apporté par Farah Lizotte et Andréanne Guay sans qui de nombreuses expériences de laboratoires et animales auraient tourné à la catastrophe. Leurs retours d'expériences et leurs bons conseils m'ont permis de m'enrichir scientifiquement et personnellement.

Je tiens également à remercier ma famille qui m'a toujours soutenue durant mon parcours universitaire et pour les valeurs qu'ils m'ont donné dans la vie. Pour terminer, un merci particulier à ma conjointe Mélyssa pour son soutien et à notre petite fille Agathe, à qui j'espère transmettre l'amour des sciences que l'université m'aura transmis ces 6 dernières années.

Liste des références

Abbasi, Fahim, Byron William Brown, Cindy Lamendola, Tracey McLaughlin, et Gerald M Reaven. 2002. « Relationship between Obesity, Insulin Resistance, and Coronary Heart Disease Risk ». *Journal of the American College of Cardiology* 40 (5): 937-43. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)02051-X](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)02051-X).

Abram, Clare L., et Clifford A. Lowell. 2017. « Shp1 Function in Myeloid Cells ». *Journal of Leukocyte Biology* 102 (3): 657-75. <https://doi.org/10.1189/jlb.2MR0317-105R>.

Cuvelier C., Cabaraux J.-F., Dufrasne I., Hornick J.-L., Istasse L. « Acides gras - nomenclature et sources alimentaires.pdf ». *Ann. Méd. Vét.*, 2004, **148**, 133-140

Aguirre, Vincent, Tohru Uchida, Lynne Yenush, Roger Davis, et Morris F. White. 2000. « The C-Jun NH₂-Terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser³⁰⁷ ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (12): 9047-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.9047>.

Ajuwon, Kolapo M, et Michel E Spurlock « Palmitate Activates the NF- κ B Transcription Factor and Induces IL-6 and TNF α Expression in 3T3-L1 Adipocytes », 2005.

Al-Mutairi, Mashael S., Laurence C. Cadalbert, H. Adrienne McGachy, Muhannad Shweash, Juliane Schroeder, Magdalena Kurnik, Callum M. Sloss, Clare E. Bryant, James Alexander, et Robin Plevin. 2010. « MAP Kinase Phosphatase-2 Plays a Critical Role in Response to Infection by *Leishmania Mexicana* ». Édité par Ingrid Müller. *PLoS Pathogens* 6 (11): e1001192. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001192>.

Andersson, Charlotte, Andrew D. Johnson, Emelia J. Benjamin, Daniel Levy, et Ramachandran S. Vasan. 2019. « 70-Year Legacy of the Framingham Heart Study ». *Nature Reviews Cardiology* 16 (11): 687-98. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0202-5>.

Bevilacqua, Michael P, Jordan S Pober, M Elyse Wheeler, et Ramzi S Cotran. 1985

« Interleukin-1 Activation of Vascular Endothelium » 121 (3): 10.

Bi, Ying, Jixiang Chen, Feng Hu, Jing Liu, Man Li, et Lei Zhao. 2019. « M2 Macrophages as a Potential Target for Antiatherosclerosis Treatment ». *Neural Plasticity* 2019 (février): 1-21. <https://doi.org/10.1155/2019/6724903>.

Blüher, Matthias. 2019. « Obesity: Global Epidemiology and Pathogenesis ». *Nature Reviews Endocrinology* 15 (5): 288-98. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.

Boring, Landin, Jennifa Gosling, Michael Cleary, et Israel F. Charo. 1998. « Decreased Lesion Formation in CCR2^{-/-} Mice Reveals a Role for Chemokines in the Initiation of Atherosclerosis ». *Nature* 394 (6696): 894-97. <https://doi.org/10.1038/29788>.

Cardilo-Reis, Larissa, Sabrina Gruber, Sabine M. Schreier, Maik Drechsler, Nikolina Papac-Milicevic, Christian Weber, Oswald Wagner, Herbert Stangl, Oliver Soehnlein, et Christoph J. Binder. 2012. « Interleukin-13 Protects from Atherosclerosis and Modulates Plaque Composition by Skewing the Macrophage Phenotype ». *EMBO Molecular Medicine* 4 (10): 1072-86. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201374>.

Carta, Gianfranca, Elisabetta Murru, Sebastiano Banni, et Claudia Manca. 2017. « Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications ». *Frontiers in Physiology* 8 (novembre): 902. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00902>.

Carvalho, Carla de, et Maria Caramujo. 2018. « The Various Roles of Fatty Acids ». *Molecules* 23 (10): 2583. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>.

Caunt, Christopher J., et Stephen M. Keyse. 2013. « Dual-Specificity MAP Kinase Phosphatases (MKPs): Shaping the Outcome of MAP Kinase Signalling ». *FEBS Journal* 280 (2): 489-504. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08716.x>.

Coll, T., M. Jove, R. Rodriguez-Calvo, E. Eyre, X. Palomer, R. M. Sanchez, M. Merlos, J.

C. Laguna, et M. Vazquez-Carrera. 2006. « Palmitate-Mediated Downregulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Coactivator 1 in Skeletal Muscle Cells Involves MEK1/2 and Nuclear Factor- B Activation ». *Diabetes* 55 (10): 2779-87. <https://doi.org/10.2337/db05-1494>.

Combadière, Christophe, Stéphane Potteaux, Mathieu Rodero, Tabassome Simon, Adeline Pezard, Bruno Esposito, Régine Merval, Amanda Proudfoot, Alain Tedgui, et Ziad Mallat. 2008. « Combined Inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 Abrogates Ly6C^{hi} and Ly6C^{lo} Monocytosis and Almost Abolishes Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Mice ». *Circulation* 117 (13): 1649-57. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.745091>.

G. N. ANDERSEN, K. CAIDAH, E. KAZZAM, A. PETERSSON, A. WALDENSTROM, L. MINCHEVA-NILSSON, and S. RANTAPÄÄ-DAHLQVIST « Correlation between Increased Nitric Oxide Production and Markers of Endothelial Activation in Systemic Sclerosis: Findings with the Soluble Adhesion Molecules E-selectin, Intercellular Adhesion Molecule 1, and Vascular Cell Adhesion Molecule 1 » Vol. 43, No. 5, May 2000, pp 1085–1093.

Couvert, Philippe, Philippe Giral, Dominique Bonnefont-Rousselot, et Alain Carrié. 2010. « Les dyslipidémies héréditaires ». *Revue Francophone des Laboratoires* 2010 (425): 73-85. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(10\)70646-8](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(10)70646-8).

Craige, Siobhan M., Shashi Kant, Michaela Reif, Kai Chen, Yongmei Pei, Rebecca Angoff, Koichi Sugamura, Timothy Fitzgibbons, et John F. Keaney. 2015. « Endothelial NADPH Oxidase 4 Protects ApoE^{-/-} Mice from Atherosclerotic Lesions ». *Free Radical Biology and Medicine* 89 (décembre): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.004>.

Criqui, Michael H, et Victor Aboyans. « Epidemiology of Peripheral Artery Disease », *Circ Res.* 2015;116:1509-1526. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303849.

Cui, Jie, Ming Zhang, Yong-qing Zhang, et Zhi-heng Xu. 2007. « JNK Pathway: Diseases and Therapeutic Potential ». *Acta Pharmacologica Sinica* 28 (5): 601-8. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00579.x>.

Danzaki, Keiko, Yutaka Matsui, Masahiro Ikesue, Daichi Ohta, Koyu Ito, Masashi Kanayama, Daisuke Kurotaki 2012. « Interleukin-17A Deficiency Accelerates Unstable Atherosclerotic Plaque Formation in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (2): 273-80. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.229997>.

Davenport, Piers, et Peter G. Tipping. 2003. « The Role of Interleukin-4 and Interleukin-12 in the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *The American Journal of Pathology* 163 (3): 1117-25. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63471-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63471-2).

Dawber, Thomas R, et George V Mann. « Coronary Heart Disease in the Framingham Study », *CELL METABOLISM* : April 2005.

Denhez, Benoit, Marina Rousseau, David-Alexandre Dancosst, Farah Lizotte, Andréanne Guay, Mannix Auger-Messier, Anne Marie Côté, et Pedro Geraldès. 2019. « Diabetes-Induced DUSP4 Reduction Promotes Podocyte Dysfunction and Progression of Diabetic Nephropathy ». *Diabetes* 68 (5): 1026-39. <https://doi.org/10.2337/db18-0837>.

Deshmane, Satish L., Sergey Kremlev, Shohreh Amini, et Bassel E. Sawaya. 2009. « Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview ». *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29 (6): 313-26. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>.

Di Paolo, Nelson C, et Dmitry M Shayakhmetov. 2016. « Interleukin 1 α and the Inflammatory Process ». *Nature Immunology* 17 (8): 906-13.

<https://doi.org/10.1038/ni.3503>.

Domschke, Gabriele, et Christian A. Gleissner. 2019. « CXCL4-Induced Macrophages in Human Atherosclerosis ». *Cytokine* 122 (octobre): 154141. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.08.021>.

Elkhawad, Maysoon, James H.F. Rudd, Lea Sarov-Blat, Gengqian Cai, Richard Wells, L. Ceri Davies, David J. Collier 2012. « Effects of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibition on Vascular and Systemic Inflammation in Patients With Atherosclerosis ». *JACC: Cardiovascular Imaging* 5 (9): 911-22. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2012.02.016>.

Emini Veseli, Besa, Paola Perrotta, Gregory R.A. De Meyer, Lynn Roth, Carole Van der Donckt, Wim Martinet, et Guido R.Y. De Meyer. 2017. « Animal Models of Atherosclerosis ». *European Journal of Pharmacology* 816 (décembre): 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.010>.

Fahy, Eoin, Dawn Cotter, Manish Sud, et Shankar Subramaniam. 2011. « Lipid Classification, Structures and Tools ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811 (11): 637-47. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009>.

Freigang, Stefan, Franziska Ampenberger, Adrienne Weiss, Thirumala-Devi Kanneganti, Yoichiro Iwakura, Martin Hersberger, et Manfred Kopf. 2013. « Fatty Acid-Induced Mitochondrial Uncoupling Elicits Inflammasome-Independent IL-1 α and Sterile Vascular Inflammation in Atherosclerosis ». *Nature Immunology* 14 (10): 1045-53. <https://doi.org/10.1038/ni.2704>.

Gaetano, Monica de, Daniel Crean, Mary Barry, et Orina Belton. 2016. « M1- and M2-Type Macrophage Responses Are Predictive of Adverse Outcomes in Human Atherosclerosis ». *Frontiers in Immunology* 7 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00275>.

Galkina, Elena, et Klaus Ley. 2007. « Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (11): 2292-2301. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.149179>.

Gleissner, Christian A., Iftach Shaked, Kristina M. Little, et Klaus Ley. 2010. « CXC Chemokine Ligand 4 Induces a Unique Transcriptome in Monocyte-Derived Macrophages ». *The Journal of Immunology* 184 (9): 4810-18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901368>.

Gong, Xiaowei, Xiaoyan Ming, Peng Deng, et Yong Jiang. 2010. « Mechanisms Regulating the Nuclear Translocation of P38 MAP Kinase ». *Journal of Cellular Biochemistry* 110 (6): 1420-29. <https://doi.org/10.1002/jcb.22675>.

Gordon, Siamon, Annette Plüddemann, et Fernando Martinez Estrada. 2014. « Macrophage Heterogeneity in Tissues: Phenotypic Diversity and Functions ». *Immunological Reviews* 262 (1): 36-55. <https://doi.org/10.1111/imr.12223>.

Gregersen, Ida, Mona Skjelland, Sverre Holm, Kirsten B. Holven, Kirsten Krogh-Sørensen, David Russell, Erik T. Askevold 2013. « Increased Systemic and Local Interleukin 9 Levels in Patients with Carotid and Coronary Atherosclerosis ». Édité par Joseph El Khoury. *PLoS ONE* 8 (8): e72769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072769>.

Gupta, Sanjay, Anne Marie Pablo, Xian-cheng Jiang, Nan Wang, Alan R Tall, et Christian Schindler. « IFN Potentiates Atherosclerosis in ApoE Knock-out Mice », Volume 99, Number 11, June 1997, 2752–2761.

Heinonen, Krista M., et Michel L. Tremblay. 2006. « Protein Tyrosine Phosphatase 1B in Hematopoiesis ». *Cell Cycle* 5 (10): 1053-56. <https://doi.org/10.4161/cc.5.10.2735>.

Hsu, Shu-Fang, Yu-Bin Lee, Ying-Chu Lee, Ai-Ling Chung, Maria Karmella Apaya, Lie-Fen Shyur, Ching-Feng Cheng, Feng-Ming Ho, et Tzu-Ching Meng. 2018. « Dual Specificity Phosphatase DUSP 6 Promotes Endothelial Inflammation through Inducible Expression of ICAM-1 ». *The FEBS Journal* 285 (9): 1593-1610. <https://doi.org/10.1111/febs.14425>.

Hu, Yanhua, Hermann Dietrich, Bernhard Metzler, Georg Wick, et Qingbo Xu. 2000. « Hyperexpression and Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK1/2) in Atherosclerotic Lesions of Cholesterol-Fed Rabbits ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (1): 18-26. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.1.18>.

Huang, Ying, Haiying Hu, Ling Liu, Jing Ye, Zhen Wang, Bin Que, Wenjing Liu, 2019. « Interleukin-12p35 Deficiency Reverses the Th1/Th2 Imbalance, Aggravates the Th17/Treg Imbalance, and Ameliorates Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice ». *Mediators of Inflammation* 2019 (avril): 1-12. <https://doi.org/10.1155/2019/3152040>.

Hundal, Rajinder S., Antonio Gómez-Muñoz, Jennifer Y. Kong, Baljinder S. Salh, Anthony Marotta, Vincent Duronio, et Urs P. Steinbrecher. 2003. « Oxidized Low Density Lipoprotein Inhibits Macrophage Apoptosis by Blocking Ceramide Generation, Thereby Maintaining Protein Kinase B Activation and Bcl-X_L Levels ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (27): 24399-408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209179200>.

Hyde, Craig L., Alan MacInnes, Frances A. Sanders, John F. Thompson, Richard A. Mazzeella, Ole Faergeman, Diederik F. van Wijk, Linda Wood, Maruja Lira, et Sara A. Paciga. 2010. « Genetic Association of the CCR5 Region With Lipid Levels in At-Risk Cardiovascular Patients ». *Circulation: Cardiovascular Genetics* 3 (2): 162-68. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.109.897793>.

Imaizumi, Satoshi, Victor Grijalva, Saul Priceman, Lily Wu, Feng Su, Robin Farias-Eisner, Susan Hama, Mohamad Navab, Alan M. Fogelman, et Srinivasa T. Reddy. 2010. « Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 Deficiency Decreases Atherosclerosis in Apolipoprotein E Null Mice by Reducing Monocyte Chemoattractant Protein-1

Levels ». *Molecular Genetics and Metabolism* 101 (1): 66-75.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.05.009>.

« Impact of Dietary Fatty Acids on Macrophage Lipid Metabolism, Signaling and Function ». 2020. *Immunometabolism*. <https://doi.org/10.20900/immunometab20200008>.

Jacob, Asha, Albert Smolenski, Suzanne M Lohmann, et Najma Begum. 2004. « MKP-1 Expression and Stabilization and CGK I α Prevent Diabetes- Associated Abnormalities in VSMC Migration » 287: 10.

Johansen, Christopher T., et Robert A. Hegele. 2012. « The Complex Genetic Basis of Plasma Triglycerides ». *Current Atherosclerosis Reports* 14 (3): 227-34.
<https://doi.org/10.1007/s11883-012-0243-2>.

Jones, Kl, Jj Maguire, et Ap Davenport. 2011. « Chemokine Receptor CCR5: From AIDS to Atherosclerosis: CCR5: From AIDS to Atherosclerosis ». *British Journal of Pharmacology* 162 (7): 1453-69. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01147.x>.

Junttila, Ilkka S. 2018. « Tuning the Cytokine Responses: An Update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 Receptor Complexes ». *Frontiers in Immunology* 9 (juin): 888.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00888>.

Kak, Gunjan, Mohsin Raza, et Brijendra K Tiwari. 2018. « Interferon-Gamma (IFN- γ): Exploring Its Implications in Infectious Diseases ». *Biomolecular Concepts* 9 (1): 64-79.
<https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0007>.

Kapourchali, Fatemeh Ramezani, Gangadaran Surendiran, Amy Goulet, et Mohammed H Moghadasian. s. d. « The Role of Dietary Cholesterol in Lipoprotein Metabolism and Related Metabolic Abnormalities: A Min », 9.

King, Victoria L., Stephen J. Szilvassy, et Alan Daugherty. 2002. « Interleukin-4

Deficiency Decreases Atherosclerotic Lesion Formation in a Site-Specific Manner in Female LDL Receptor^{-/-} Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (3): 456-61. <https://doi.org/10.1161/hq0302.104905>.

Knutsson, Anki, Harry Björkbacka, Pontus Dunér, Gunnar Engström, Christoph J. Binder, Anna Hultgårdh Nilsson, et Jan Nilsson. 2019. « Associations of Interleukin-5 With Plaque Development and Cardiovascular Events ». *JACC: Basic to Translational Science* 4 (8): 891-902. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.07.002>.

Korbecki, Jan, et Karolina Bajdak-Rusinek. 2019. « The Effect of Palmitic Acid on Inflammatory Response in Macrophages: An Overview of Molecular Mechanisms ». *Inflammation Research* 68 (11): 915-32. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01273-5>.

Kyriakis, John M., et Joseph Avruch. 2012. « Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update ». *Physiological Reviews* 92 (2): 689-737. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2011>.

Lang, Roland, Michael Hammer, et Jörg Mages. 2006. « DUSP Meet Immunology: Dual Specificity MAPK Phosphatases in Control of the Inflammatory Response ». *The Journal of Immunology* 177 (11): 7497-7504. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7497>.

Lee, Myoungsoo, Yongsung Lee, Jihye Song, Junhyung Lee, et Sun-Young Chang. 2018. « Tissue-Specific Role of CX₃CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships with Human Disease ». *Immune Network* 18 (1): e5. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e5>.

Li, Na, James E. McLaren, Daryn R. Michael, Mathew Clement, Ceri A. Fielding, et Dipak P. Ramji. 2010. « ERK Is Integral to the IFN- γ -Mediated Activation of STAT1, the Expression of Key Genes Implicated in Atherosclerosis, and the Uptake of Modified Lipoproteins by Human Macrophages ». *The Journal of Immunology* 185 (5): 3041-48. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000993>.

Li, Qingfei. 2020. « Polyunsaturated Fatty Acids Influence LPS-Induced Inflammation of Fish Macrophages Through Differential Modulation of Pathogen ». *Frontiers in Immunology* 11: 11.

Libby, P, S J Warner, et G B Friedman. 1988. « Interleukin 1: A Mitogen for Human Vascular Smooth Muscle Cells That Induces the Release of Growth-Inhibitory Prostanoids. » *Journal of Clinical Investigation* 81 (2): 487-98. <https://doi.org/10.1172/JCI113346>.

Libby, Peter. 2017. « Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy ». *Journal of the American College of Cardiology* 70 (18): 2278-89. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.09.028>.

Lopez-Castejon, Gloria, et David Brough. 2011. « Understanding the Mechanism of IL-1 β Secretion ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22 (4): 189-95. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>.

Luckheeram, Rishi Vishal, Rui Zhou, Asha Devi Verma, et Bing Xia. 2012. « CD4⁺ T Cells: Differentiation and Functions ». *Clinical and Developmental Immunology* 2012: 1-12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>.

Macrae, Katherine, Clare Stretton, Christopher Lipina, Agnieszka Blachnio-Zabielska, Marcin Baranowski, Jan Gorski, Anna Marley, et Harinder S. Hundal. 2013. « Defining the Role of DAG, Mitochondrial Function, and Lipid Deposition in Palmitate-Induced Proinflammatory Signaling and Its Counter-Modulation by Palmitoleate ». *Journal of Lipid Research* 54 (9): 2366-78. <https://doi.org/10.1194/jlr.M036996>.

Mallat, Ziad, Soraya Taleb, Hafid Ait-Oufella, et Alain Tedgui. 2009. « The Role of Adaptive T Cell Immunity in Atherosclerosis: Fig. 1. » *Journal of Lipid Research* 50 (Supplement): S364-69. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800092-JLR200>.

Mayer, Ruth J., et James F. Callahan. 2006. « P38 MAP Kinase Inhibitors: A Future Therapy for Inflammatory Diseases ». *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 3 (1): 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2006.03.003>.

McKay, M M, et D K Morrison. 2007. « Integrating Signals from RTKs to ERK/MAPK ». *Oncogene* 26 (22): 3113-21. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210394>.

Michlewska, Sylwia, Ian Dransfield, Ian L. Megson, et Adriano G. Rossi. 2009. « Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Is Critically Regulated by the Opposing Actions of Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Agents: Key Role for TNF- α ». *The FASEB Journal* 23 (3): 844-54. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121228>.

Montague, Carl T., I. Sadaf Farooqi, Jonathan P. Whitehead, Maria A. Soos, Harald Rau, Nicholas J. Wareham, Ciaran P. Sewter 1997. « Congenital Leptin Deficiency Is Associated with Severe Early-Onset Obesity in Humans ». *Nature* 387 (6636): 903-8. <https://doi.org/10.1038/43185>.

Nakashima, Yutaka, Elaine W. Raines, Andrew S. Plump, Jan L. Breslow, et Russell Ross. 1998. « Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at Atherosclerosis-Prone Sites on the Endothelium in the ApoE-Deficient Mouse ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18 (5): 842-51. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.18.5.842>.

Nassar, Taher, Bruce S. Sachais, Sa'ed Akkawi, Maria Anna Kowalska, Khalil Bdeir, Eran Leitersdorf, Edna Hiss 2003. « Platelet Factor 4 Enhances the Binding of Oxidized Low-Density Lipoprotein to Vascular Wall Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (8): 6187-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208894200>.

Neamatallah, Thikryat, Shilan Jabbar, Rothwelle Tate, Julianne Schroeder, Muhannad Shweash, James Alexander, et Robin Plevin. 2019. « Whole Genome Microarray Analysis of DUSP4-Deletion Reveals A Novel Role for MAP Kinase Phosphatase-2 (MKP-2) in Macrophage Gene Expression and Function ». *International Journal of Molecular*

Sciences 20 (14): 3434. <https://doi.org/10.3390/ijms20143434>.

Nowak, Witold N., Jiacheng Deng, Xiong Z. Ruan, et Qingbo Xu. 2017. « Reactive Oxygen Species Generation and Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37 (5). <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309228>.

Ohta, Hirotoshi, Hisayasu Wada, Tamikazu Niwa, Hirokazu Kirii, Naoki Iwamoto, Hidehiko Fujii, Kuniaki Saito, Kenji Sekikawa, et Mitsuru Seishima. 2005. « Disruption of Tumor Necrosis Factor- α Gene Diminishes the Development of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice ». *Atherosclerosis* 180 (1): 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.016>.

Oppi, Sara, Thomas F. Lüscher, et Sokrates Stein. 2019. « Mouse Models for Atherosclerosis Research—Which Is My Line? » *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 6 (avril): 46. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00046>.

O’Rahilly, Stephen, et I.Sadaf Farooqi. 2006. « Genetics of Obesity ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361 (1471): 1095-1105. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1850>.

Ota, Noriyasu, Satoko Soga, Tadashi Hase, Ichiro Tokimitsu, et Takatoshi Murase. 2007. « Dietary Diacylglycerol Induces the Regression of Atherosclerosis in Rabbits ». *The Journal of Nutrition* 137 (5): 1194-99. <https://doi.org/10.1093/jn/137.5.1194>.

Palasubramaniam, Jathushan, Xiaowei Wang, et Karlheinz Peter. 2019. « Myocardial Infarction—From Atherosclerosis to Thrombosis: Uncovering New Diagnostic and Therapeutic Approaches ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 39 (8). <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312578>.

Parameswaran, Narayanan, et Sonika Patial. 2010. « Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages ». *Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression* 20 (2): 87-103.

<https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v20.i2.10>.

Patel, Shilpesh S., Ram Thiagarajan, James T. Willerson, et Edward T. H. Yeh. 1998. « Inhibition of α_4 Integrin and ICAM-1 Markedly Attenuate Macrophage Homing to Atherosclerotic Plaques in ApoE-Deficient Mice ». *Circulation* 97 (1): 75-81. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.1.75>.

Pepino, Marta Yanina, Ondrej Kuda, Dmitri Samovski, et Nada A. Abumrad. 2014. « Structure-Function of CD36 and Importance of Fatty Acid Signal Transduction in Fat Metabolism ». *Annual Review of Nutrition* 34 (1): 281-303. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161220>.

Pinderski Oslund, Laura J., Catherine C. Hedrick, Tristana Olvera, Amy Hagenbaugh, Mary Territo, Judith A. Berliner, et Alistair I. Fyfe. 1999. « Interleukin-10 Blocks Atherosclerotic Events In Vitro and In Vivo ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19 (12): 2847-53. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.12.2847>.

Rader, Daniel J, et Ellen Puré. 2005. « Lipoproteins, Macrophage Function, and Atherosclerosis: Beyond the Foam Cell? » *CELL METABOLISM*, 8.

Raes, Geert, Patrick De Baetselier, et Gholamreza Hassanzadeh Gh. « Differential Expression of FIZZ1 and Ym1 in Alternatively versus Classically Activated Macrophages », *Journal of Leukocyte Biology* Volume 71, April 2002.

Reustle, Anna, et Michael Torzewski. 2018. « Role of P38 MAPK in Atherosclerosis and Aortic Valve Sclerosis ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (12): 3761. <https://doi.org/10.3390/ijms19123761>.

Ricci, R. 2004. « Requirement of JNK2 for Scavenger Receptor A-Mediated Foam Cell Formation in Atherogenesis ». *Science* 306 (5701): 1558-61. <https://doi.org/10.1126/science.1101909>.

Riera-Borrull, Marta, Víctor D. Cuevas, Bárbara Alonso, Miguel A. Vega, Jorge Joven, Elena Izquierdo, et Ángel L. Corbí. 2017. « Palmitate Conditions Macrophages for Enhanced Responses toward Inflammatory Stimuli via JNK Activation ». *The Journal of Immunology* 199 (11): 3858-69. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700845>.

Robbesyn, Fanny, Robert Salvayre, et Anne Negre-Salvayre. 2004. « Dual Role of Oxidized LDL on the NF-KappaB Signaling Pathway ». *Free Radical Research* 38 (6): 541-51. <https://doi.org/10.1080/10715760410001665244>.

Roberts, P J, et C J Der. 2007. « Targeting the Raf-MEK-ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade for the Treatment of Cancer ». *Oncogene* 26 (22): 3291-3310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>.

Rosenson, Robert S., H. Bryan Brewer, W. Sean Davidson, Zahi A. Fayad, Valentin Fuster, James Goldstein, Marc Hellerstein 2012. « Cholesterol Efflux and Atheroprotection: Advancing the Concept of Reverse Cholesterol Transport ». *Circulation* 125 (15): 1905-19. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066589>.

Ryoo, S. 2004. « Native LDL Induces Interleukin-8 Expression via H₂O₂, P38 Kinase, and Activator Protein-1 in Human Aortic Smooth Muscle Cells ». *Cardiovascular Research* 62 (1): 185-93. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.01.002>.

Saigusa, Ryosuke, Holger Winkels, et Klaus Ley. 2020. « T Cell Subsets and Functions in Atherosclerosis ». *Nature Reviews Cardiology*, mars. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0352-5>.

Sakaguchi, H., M. Takeya, H. Suzuki, H. Hakamata, T. Kodama, S. Horiuchi, S. Gordon, 1998. « Role of Macrophage Scavenger Receptors in Diet-Induced Atherosclerosis in Mice ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 78 (4): 423-34.

Schieffer, Bernhard, Tina Selle, Andres Hilfiker, Denise Hilfiker-Kleiner, Karsten Grote, Uwe J.F. Tietge, Christian Trautwein 2004. « Impact of Interleukin-6 on Plaque Development and Morphology in Experimental Atherosclerosis ». *Circulation* 110 (22): 3493-3500. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000148135.08582.97>.

Shen, Jianzhong, Unni M. Chandrasekharan, Mohammad Z. Ashraf, Eric Long, Richard E. Morton, Yusen Liu, Jonathan D. Smith, et Paul E. DiCorleto. 2010. « Lack of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 Protects ApoE-Null Mice Against Atherosclerosis ». *Circulation Research* 106 (5): 902-10. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.198069>.

Shoelson, Steven E., Laura Herrero, et Afia Naaz. 2007. « Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance ». *Gastroenterology* 132 (6): 2169-80. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.059>.

Smith, Emily, Konkal-Matt R. Prasad, Matthew Butcher, Anca Dobrian, Jay K. Kolls, Klaus Ley, et Elena Galkina. 2010. « Blockade of Interleukin-17A Results in Reduced Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Circulation* 121 (15): 1746-55. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.924886>.

Steinberg, Daniel. 2009. « The LDL Modification Hypothesis of Atherogenesis: An Update ». *Journal of Lipid Research* 50 (Supplement): S376-81. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800087-JLR200>.

Steinbrecher, U. P., S. Parthasarathy, D. S. Leake, J. L. Witztum, et D. Steinberg. 1984. « Modification of Low Density Lipoprotein by Endothelial Cells Involves Lipid Peroxidation and Degradation of Low Density Lipoprotein Phospholipids. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (12): 3883-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.12.3883>.

Swirski, Filip K., Peter Libby, Elena Aikawa, Pilar Alcaide, F. William Luscinskas, Ralph

Weissleder, et Mikael J. Pittet. 2007. « Ly-6Chi Monocytes Dominate Hypercholesterolemia-Associated Monocytosis and Give Rise to Macrophages in Atheromata ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (1): 195-205. <https://doi.org/10.1172/JCI29950>.

Tacke, Frank, David Alvarez, Theodore J. Kaplan, Claudia Jakubzick, Rainer Spanbroek, Jaime Llodra, Alexandre Garin 2007. « Monocyte Subsets Differentially Employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to Accumulate within Atherosclerotic Plaques ». *Journal of Clinical Investigation* 117 (1): 185-94. <https://doi.org/10.1172/JCI28549>.

Tonks, Nicholas K. 2006. « Protein Tyrosine Phosphatases: From Genes, to Function, to Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (11): 833-46. <https://doi.org/10.1038/nrm2039>.

Torres, Nimbe, Martha Guevara-Cruz, Laura A. Velázquez-Villegas, et Armando R. Tovar. 2015. « Nutrition and Atherosclerosis ». *Archives of Medical Research* 46 (5): 408-26. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.05.010>.

Uyemura, K, L L Demer, S C Castle, D Jullien, J A Berliner, M K Gately, R R Warrier, N Pham, A M Fogelman, et R L Modlin. 1996. « Cross-Regulatory Roles of Interleukin (IL)-12 and IL-10 in Atherosclerosis. » *Journal of Clinical Investigation* 97 (9): 2130-38. <https://doi.org/10.1172/JCI118650>.

Vacek, Thomas, Shahnaz Rahman, Shipeng Yu, Diana Neamtu, Srikanth Givimani, et Suresh Tyagi. 2015. « Matrix Metalloproteinases in Atherosclerosis: Role of Nitric Oxide, Hydrogen Sulfide, Homocysteine, and Polymorphisms ». *Vascular Health and Risk Management*, février, 173. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S68415>.

Vromman, Amélie, Victoria Ruvkun, Eugenia Shvartz, Gregory Wojtkiewicz, Gustavo Santos Masson, Yevgenia Tesmenitsky, Eduardo Folco 2019. « Stage-Dependent Differential Effects of Interleukin-1 Isoforms on Experimental Atherosclerosis ». *European Heart Journal* 40 (30): 2482-91. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz008>.

Wade, Fallou, Karim Belhaj, et Coralie Poizat. 2018. « Protein Tyrosine Phosphatases in Cardiac Physiology and Pathophysiology ». *Heart Failure Reviews* 23 (2): 261-72. <https://doi.org/10.1007/s10741-018-9676-1>.

Wende, Adam R., J. David Symons, et E. Dale Abel. 2012. « Mechanisms of Lipotoxicity in the Cardiovascular System ». *Current Hypertension Reports* 14 (6): 517-31. <https://doi.org/10.1007/s11906-012-0307-2>.

West, K. M., M. M. S. Ahuja, P. H. Bennett, A. Czyzyk, O. M. De Acosta, J. H. Fuller, B. Grab 1983. « The Role of Circulating Glucose and Triglyceride Concentrations and Their Interactions with Other “Risk Factors” as Determinants of Arterial Disease in Nine Diabetic Population Samples from the WHO Multinational Study ». *Diabetes Care* 6 (4): 361-69. <https://doi.org/10.2337/diacare.6.4.361>.

Woller, G., E. Brandt, J. Mittelstadt, C. Rybakowski, et F. Petersen. 2008. « Platelet Factor 4/CXCL4-Stimulated Human Monocytes Induce Apoptosis in Endothelial Cells by the Release of Oxygen Radicals ». *Journal of Leukocyte Biology* 83 (4): 936-45. <https://doi.org/10.1189/jlb.0907592>.

Woollard, Kevin J., et Frederic Geissmann. 2010. « Monocytes in Atherosclerosis: Subsets and Functions ». *Nature Reviews Cardiology* 7 (2): 77-86. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.228>.

Wuttge, Dirk M., Xinghua Zhou, Yuri Sheikine, Dick Wågsäter, Veronika Stemme, Ulf Hedin, Sten Stemme, Göran K. Hansson, et Allan Sirsjö. 2004. « CXCL16/SR-PSOX Is an Interferon- γ -Regulated Chemokine and Scavenger Receptor Expressed in Atherosclerotic Lesions ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (4): 750-55. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000124102.11472.36>.

Xue, Xie-Hua, Feng-Fei Shi, Tong Chen, Wei Wei, Xiao-Mao Zhou, et Li-Dian Chen.

2016. « Inhibition of ERK1/2 Improves Lipid Balance in Rat Macrophages via ABC A1/G1 and CD36 ». *Molecular Medicine Reports* 13 (2): 1533-40. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4697>.

Zhang, W., T. Tang, D. Nie, S. Wen, C. Jia, Z. Zhu, N. Xia, 2015. « IL-9 Aggravates the Development of Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice ». *Cardiovascular Research* 106 (3): 453-64. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv110>.

Zhao, W, T Lei, H Li, D Sun, X Mo, Z Wang, K Zhang, et H Ou. 2015. « Macrophage-Specific Overexpression of Interleukin-5 Attenuates Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice ». *Gene Therapy* 22 (8): 645-52. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.33>.